

**IMPORTANCIA DEL GEN SH3 Y SU RELACION CON LA RESISTENCIA A LA  
ENFERMEDAD ROYA DEL CAFETO *Hemileia vastatrix* BAJO LA MODALIDAD DE  
COMPILACION BIBLIOGRAFICA**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE:**

**ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGIA AGRARIA**

**POR**

**NICOLÁS ALZATE OCAMPO**

**ASESORA**

**ANGELA LILIANA RIVERA CALDERON I.A. M Sc.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA: ESCUELA DE CIENCIAS  
AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE ECAPMA**

**MEDELLIN, COLOMBIA 2015.**

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	4
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCION.....	12
2. JUSTIFICACION.....	15
3. OBJETIVO GENERAL:.....	17
3.1. Objetivos específicos: .....	17
4. REVISION DE LITERATURA .....	18
4.1. Taxonomía de la especie .....	20
4.2. Grupo genético .....	20
4.2.1. Variedad caturra .....	20
4.3 Biología floral .....	21
4.4. Importancia de la roya del cafeto <i>Hemileia vastatrix</i> . .....	23
4.5. Distribución geográfica de la roya .....	25
4.6. Hospedante.....	26
4.6.1 Ciclo biológico de la enfermedad .....	26
4.6.2 Descripción Morfológica.....	28
4.6.3 Síntomas y Daños.....	29
4.6.4. Aspectos Epidemiológicos .....	30
4.6.5. Sobrevivencia .....	30
4.6.6. Dispersión .....	30
4.6.7 Multiplicación .....	31
4.6.8. El mejoramiento genético.....	31
4.7. Genética del café .....	33
4.7.1. Identificación de genes responsables de enfermedades .....	33
4.7.2. Mejoramiento genético de café y la importancia de la variedad caturra .....	35
4.7.3. Heredabilidad de la resistencia y tipo. ....	36
4.8. Genes ligados a la resistencia de <i>Hemileia vastratix</i> cultivo del cafeto (Gen SH3) .....	37
4.8.1. Genes involucrados en la resistencia .....	37
4.8.2 Caracterización de secuencias de la familia SH3 –CNL .....	50
4.8.3. Evolución de la roya en lotes comerciales. ....	61

5. ASPECTOS METODOLOGICOS .....	64
6. RESULTADOS Y DISCUSION .....	65
7. CONCLUSIONES .....	78
8. RECOMENDACIONES.....	82
9. REFERENCIAS .....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flor de café	21
Figura 2: Distribución mundial de <i>H. vastatrix</i>	26
Figura 3: Ciclo biológico (patogénesis) de la roya del cafeto <i>Hemileia vastatrix</i>	28
Figura 4: a-b) Fotografía en microscopio de barrido correspondiente a las urediniosporas del hongo; c-d) acercamiento de los síntomas de la roya del cafeto (soros).	29
Figura 5: Síntomas <i>H. vastratix</i> . Afección de hoja	30
Figura 6 Aislamiento de ADN Fuente: Alzate, 2014.	34
Figura 7. Origen de la resistencia genética contra la roya en variedades comerciales de café ( <i>C. arabica</i> L.).	38
Figura 8: Niveles de resistencia de los genes SH.	39
Figura 9. Proceso de obtención de las variedades compuestas en Colombia	40
Figura 10. Obtención de poblaciones. Fuente	42
Figura 11. Introgresión del gen SH3, Fuente	43
Figura 12: Grupo de individuos “portadores del SH3”.	44
Figura 13. Seguimiento del gen SH3.	45
Figura 14 Piramidización del gen SH3	46
Figura 15: Secuencias de tres genomas de café	48
Figura 16: Evolución del locus SH3 en especies de café. Organización actual del locus SH3 en <i>Coffea canephora</i> (Cc) y <i>C. arabica</i> (sub-genoma Ea y sub-genoma Ca).	48
Figura 17: Evolución del locus SH3 en especies de café. Un modelo de la evolución del locus SH3 en las plantas de café que implican la expansión y retracción del genoma por duplicación de genes y supresiones. Las flechas grises indican miembros de la familia SH3. Las flechas abiertas indican otros genes no-R que flanquean los genes R en el locus. Flechas cortas indican versiones truncadas de los genes correspondientes	49
Imagen 18: Exon e intrón tamaño (bp) y el tamaño de la proteína (aa) de los miembros SH3 –CNL	51

Figura 19: Comparación entre los mapas genéticos del cromosoma (centro) que incluye el clon BAC 81-13H (señal en verde), citogenética (izquierda), y el fragmento de introgresión que lleva el factor de SH3 de <i>C. liberica</i> (señal en rojo). Las distancias genéticas entre loci marcador se indican en centimorgans (cM).	54
Figura 20: Analogía de la interacción <i>Hemileia vastatrix</i> -Café. a. El hongo presenta varios genes de avirulencia (V) que delatan su presencia si son detectados por los correspondientes genes de resistencia (R) presentes en café; b. En el caso de la var. Caturra, sólo posee el gen de resistencia 5, que no puede detectar al correspondiente gen de avirulencia 5 de la raza II, pues ésta no lo tiene, dando como resultado la aparición de la enfermedad; c. En las var. Colombia y Castillo, existen varios genes de resistencia que pueden detectar la presencia del patógeno y generan una reacción de resistencia.	55
Figura 21. Evolución de la roya sobre líneas mejoradas en el mundo: la experiencia de India y Brasil.	58

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución a nivel mundial de la Roya	25
Tabla 2: Presencia de genes SH en algunas variedades de café	67

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, mi familia: Margarita, Mónica, y Thomas, y a la gran ayuda y orientación de los doctores: Ángela Rivera, Gloria María Cifuentes y Reinaldo Giraldo, además del apoyo en el proceso de la doctora Nidia Carreño y Carlos Andrés Castañeda Álvarez.

## RESUMEN

El presente trabajo de grado se realizó bajo la modalidad de monografía; para su desarrollo se empleó información obtenida de diferentes bibliotecas de entidades dedicadas a la investigación en el área agrícola como son: Cenicafé, UNAD, Universidad Nacional, Universidad de Antioquia, Universidad de Santa Rosa de Cabal, Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT e internet.

Este documento se propuso documentar la importancia que tiene el gen SH3 en la búsqueda de la resistencia a la roya *Hemileia vastatrix* en el café *Coffea arabica*, con el fin de que pueda servir como fuente de información y conocimiento para estudiantes de pregrado, posgrado, y para profesionales dedicados al mejoramiento del café.

El café es el cultivo más importante en Colombia, de este no solo dependen las familias productoras que se estima son más de un millón, sino también una gran industria que se ha forjado a través de los años impulsando el desarrollo económico del país. La llegada de la roya del cafeto a comienzos de los años 80 cambió la caficultura en el país, afectando los cultivos que estaban por debajo de 1.000 msnm a tal punto que estos desaparecieron., sin embargo a través de la persistencia y el enorme esfuerzo realizado por la Federación Nacional de Cafeteros y Cenicafé, se desarrolló la variedad Colombia (resistente a Roya), que junto con estrategias optimas de manejo han permitido que la afectación al cultivo no se haya dado en proporciones inimaginables.

Por ser la roya una enfermedad devastadora, de quien se estima que las pérdidas en rendimiento están en 30% de las cosechas para solo América Latina, los mayores esfuerzos han estado destinados al manejo de dicha enfermedad.

El mejoramiento genético del café ha sido la principal estrategia para el control de la roya; siendo el Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*) el principal recurso genético empleado como fuente para la introgresión de genes que por medio de la piramidización han logrado obtener genotipos con resistencia de mayor durabilidad.

En Café, la resistencia está determinada por lo menos por nueve factores o genes dominantes (SH1 a SH9) que puede presentarse solos o en combinación. De estos factores de resistencia SH1, SH2, SH4 y SH5 han sido encontrados en *Coffea arabica*; los otros SH6, SH7, SH8 y SH9, han sido introducidos de la especie diploide *Coffea canephora* a través del híbrido de Timor, mientras que el factor SH3 proviene de *Coffea liberica*.

En los programas de mejoramiento genético en café es de destacar la importancia de la poliploidia de la especie *C arabica*, al ser la única especie del género en poseer 4 juegos de cromosomas debido a un proceso de hibridación de especies, lo que la hace un individuo interesante al poder hibridar entre especies del mismo género, dando como resultado organismos con características deseables de acuerdo a las necesidades del mejorador, en este caso la introgresión del gen SH3. La importancia de este gen radica, en que su presencia solo o en combinaciones con los genes SH1 al SH9 genera resistencia a la enfermedad *H. vastratix* haciéndolo atractivo en programas de mejoramiento genético del cultivo, para aumentar los niveles de resistencia de la enfermedad.

Los programas de mejoramiento actuales de café tienen una duración de 25 años como mínimo y teniendo en cuenta que en ocasiones, no se garantiza la obtención de un cultivar mejorado, se debe recurrir a la ayuda de otras herramientas como la selección asistida por marcadores (MAS, por sus siglas en inglés (“Marker-assisted selection”), un método que facilita la selección precoz de los genotipos, acelerando el proceso de selección mientras asegura la presencia de los genes deseados, por medio marcadores moleculares como el Sat244 y el BA-124-12K, donde la obtención de nuevos cultivares por esta vía se toma no menos de 8 a 10 años comparados con los 25 años mencionados anteriormente.

Con base en los argumentos mencionados anteriormente, es necesario aumentar la variabilidad de la especie, mediante la inclusión de nuevos genes y/o combinaciones de genes de resistencia en las variedades compuestas diseñando líneas mejoradas portadoras del gen SH3 obtenidas de *C. liberica* con el objetivo de aumentar y/o prologar la durabilidad de la resistencia a la roya obtenida de genotipos avanzados= Líneas H.T



(Hibrido de Timor) F3 y F4 x arábicas introgresados portadores de este gen, esto con el apoyo de la biotecnología, permitirá entregar nuevas variedades resistentes a los agricultores en un menor tiempo.

## ABSTRACT.

This degree work was performed in the form of a monograph; - CIAT and internet Cenicafé, UNAD, National University, University of Antioquia, University of Santa Rosa de Cabal, International Center for Tropical Agriculture: for development, information from different libraries of institutions dedicated to research in agriculture such as was used.

This document is intended to document the importance of the SH3 gene in the search for rust resistance *Hemileia vastatrix* in coffee *Coffea arabica*, so it can serve as a source of information and knowledge for undergraduate, graduate, and for professionals dedicated to improving coffee.

Coffee is the most important crop in Colombia, this not only depend on farming families are estimated over a million, but also a large industry that has developed over the years promoting economic development. The arrival of coffee rust in the early '80s changed the coffee growing in the country; affecting crops were below 1,000 meters above sea level to the point where they disappeared. However through persistence and enormous effort by the National Federation of Coffee Growers and Cenicafé, variety Colombia (resistant to rust), which together with optimal management strategies have allowed the cultivation involvement has not been developed in unimaginable proportions.

As the rust a devastating disease, of whom estimated yield losses are in 30% of crops to only Latin America, the greatest efforts have been aimed at managing the disease.

Genetic improvement of coffee has been the main strategy for the control of rust; being the Timor Hybrid (*C. arabica* x *C. canephora*) the main genetic resource used as a source for introgression of genes through piramidización have achieved genotypes with resistance durability.

In Café, at least nine factors or dominant genes (SH1 to SH9) that may occur alone or in combination determine resistance. Of these resistance factors SH1, SH2, SH4 and SH5 have been found in *Coffea arabica*; other SH6, SH7, SH8 and SH9, have been introduced

diploid species *Coffea canephora* through hybrid Timor, while the SH3 factor comes from *Coffea liberica*.

In breeding programs in coffee is to highlight the importance of polyploidy of *C arabica*, being the only species of the genus in having four sets of chromosomes due to a process of hybridization of species, which makes an individual interesting to hybridize power between species of the same genus, resulting in organisms with desirable characteristics according to the needs of the builder, in this case the SH3 gene introgression. The importance of this gene lies in their presence alone or in combination with genes SH1 to SH9 generates resistance to disease *H. vastratix* making it attractive in breeding programs of culture to increase levels of disease resistance.

The current breeding programs of coffee with a duration of at least 25 years and considering that sometimes, obtaining an improved cultivar is not guaranteed, you should seek the help of other tools such as marker-assisted selection (MAS , for its acronym in English ("Marker-assisted selection"), a method that facilitates the early selection of genotypes, accelerating the selection process while ensuring the presence of the desired genes through molecular markers as Sat244 and BA -124-12K, where obtaining new cultivars by this route takes at least 8-10 years compared with 25 years mentioned above.

Based on the arguments above, it is necessary to increase the variability of the species, through the inclusion of new genes and / or combinations of resistance genes in designing composite varieties breeding lines carrying the SH3 gene obtained from *C. liberica* order increase and / or prolong the durability of rust resistance genotypes obtained from Advanced Lines = HT (Hybrid Timor) F3 and F4 x introgressed Arabica carriers of this gene, that with the support of biotechnology will allow deliver new resistant varieties farmers in less time.

## **1. INTRODUCCION.**

El café es uno de los principales productos agrícolas del mundo que genera grandes ingresos a los países productores, siendo este uno de los principales productos del llamado “comercio justo” y su precio se fija en la bolsa de los mercados internacionales, aunque este es producido en su mayoría por pequeños campesinos y empresas familiares (Cano S.C.G. et-al 2012).

La unidad de medida es el saco de 60 kg. La producción mundial es superior a 100 millones de bolsas desde hace 5 años (145,8 millones de sacos, para 2014) De esta producción, se exportan más de 80 millones de bolsas cada año. El mayor productor es, con mucha diferencia, Brasil, especialmente el estado de Sao Paulo donde se sitúa el primer puerto cafetero del mundo: el puerto de Santos, seguido por Vietnam (el productor más importante de robusta) y Colombia. (Federación Nacional de Cafeteros 2013, citado por Alzate 2014).

La producción cafetera colombiana subió un 41% a 10,9 millones de sacos en el 2013 frente al año anterior, su crecimiento anual más alto en los últimos 36 años, (Federación Nacional de Cafeteros 2013). Existen más de 563,000 familias productoras de café habitan nuestro país desde las provincias que limitan con Ecuador, en el Sur, hasta aquellas que bordean el mar Caribe en el Norte. A lo largo de casi 3,000 kilómetros de valles interandinos, desde el extremo Sur hasta el extremo Norte de Colombia, viven los productores en nuestras regiones cafeteras. En tierra del café en Colombia se cultiva un grano de alta montaña, con plantaciones significativas en 16 departamentos de nuestro país. En su gran mayoría los cafeteros colombianos viven en pequeñas fincas o parcelas cuyos cultivos de café, en promedio, no superan las 2 hectáreas. Solamente algo más del 5% de los productores colombianos de café tienen plantaciones de un tamaño superior a las 5 hectáreas. La reducida dimensión de sus cultivos ha permitido mantener una vocación esencialmente familiar en la industria cafetera colombiana (Federación Nacional de Cafeteros 2013 citado por Alzate 2014).

Los estudios desarrollados en el cultivo han sido principalmente bajo el contexto agronómico, sin embargo el conocimiento a nivel bioquímico y molecular es aun limitado donde se destacan algunas investigaciones desarrolladas por el grupo técnico de Cenicafé, donde se han utilizado organismos, partes de organismos, enzimas o componentes del mismo para mejorarlo.

Dichas investigaciones se han realizado en torno a:

- Variabilidad morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Cercospora coffeicola*.
- Caracterización citogenética y morfológica de híbridos interespecíficos entre *C. arábica* y las especies diploides *C. liberica* y *C. eugenoides*.
- Búsqueda de secuencias homologas a genes de resistencia a insectos en el genoma de *Coffea arabica* L., C.V. Colombia.
- Análisis de secuencias de genes de *Coffea arabica* Var. Caturra.

Colombia de la mano de la Federación de Cafeteros y entidades gubernamentales se unió a dicha labor, esta inició casi al mismo tiempo que Brasil, alrededor de la década del 80. Cenicafé ha adelantado trabajos relacionados con biotecnología desde la década del 70 con el propósito de encontrar la forma de suministrar materiales con resistencia a roya y broca los cuales en esa época y con la tecnología presente en la misma los resultados y la investigación quedaban sin arrojar los datos esperados; así pues el tiempo paso y la tecnología ha avanzado y se logró caracterizar regiones cromosomales y otros elementos propios del proceso como proteínas, genes, etc. (Rojas A.R. 2013).

La formulación del programa de mejoramiento genético tendiente a la obtención de variedades con resistencia a la roya del cafeto, que se inició en 1968, permitió a Cenicafé (Autoridad investigativa colombiana en el cultivo del café) en una primera etapa, entregar a los caficultores colombianos variedades con resistencia a la enfermedad y con atributos agronómicos similares a los de las variedades tradicionales utilizadas en Colombia destacadas por su productividad y calidad. Dentro de las enfermedades limitantes del café en el mundo, la roya del cafeto o roya anaranjada causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Berk & Br), se encuentra distribuida en todas las áreas productoras de café en

el mundo, causando pérdidas de producción y aumentando los costos de aplicación. En Colombia la última epidemia severa de roya, ocurrió en los años 2008 y 2009, causando altas pérdidas de la producción, (Gonzales M.L.F. 2009).

## 2. JUSTIFICACION

Dentro de las enfermedades limitantes del café en el mundo, la roya del cafeto o roya anaranjada causada por el hongo *Hemileia vastratrix* (Berk & Br), que se encuentra distribuida en todas las áreas productoras de café en el mundo, causando pérdidas de producción del 20% al 30% y costos de aplicación de entre el 10% al 20%. En Colombia la última epidemia severa de roya, ocurrió en los años 2008 y 2009, causando pérdidas de hasta un 23% de la producción acumulada en 4 cosechas. El uso de fungicidas ha sido un método de control ampliamente utilizado, sin embargo, además de contaminar es una alternativa demasiado costosa teniendo en cuenta que los productores del grano de pequeños campesinos con máximo 3 hectáreas la mayoría de ellos. (Gonzales M.L.F. 2009).

La investigación continuada ha permitido obtener nuevos componentes que han mejorado las características iniciales de las variedades, tales como el tamaño del grano, conservando la resistencia enfermedades, entre ellas, la roya para amortiguar el efecto ocasionado por la aparición cada vez más frecuente de nuevas razas del hongo. (Alvarado A.G. 2005).

La caficultura colombiana ha estado trabajando con variedades resistentes a enfermedades, las cuales han sido desarrolladas bajo la disciplina del mejoramiento genético. Por otra parte la biología molecular ha ido ganando importancia a nivel investigativo, con las diferentes técnicas de vanguardia donde no se deja nada al azar, en este se identifican segmentos de ADN, en el cromosoma y se rastrea la herencia del organismo. Esta técnica es utilizada en genética animal, vegetal, microbiana e inclusive humana, donde se observa variación entre individuos. Lo que permite identificar la secuencia responsable de diferente carácter o resistencia a una enfermedad en particular, generando un uso potencial en un organismo con susceptibilidad a una enfermedad determinada. (Franco J.L., 2008 citado por Alzate, 2014).

Por este motivo se debe realizar un diagnóstico del conocimiento que posee el país en el contexto bioquímico y molecular de genes con resistencia a *Hemileia vastatrix* para generar investigaciones enfocadas al respecto, ya que los índices de pérdidas anuales

debido a esta enfermedad es alarmante, y siendo la utilización de agroquímicos la única solución al problema lo hace aún más preocupante.

Es importante estudiar en el país diferentes variedades compuestas con líneas de diferentes combinaciones de genes con resistencia a *Hemileia vastatrix*. La gran diversidad de variedades ha permitido la disminución de la incidencia y severidad de esta enfermedad en el cultivo por la manipulación desarrollada durante su manejo, sin embargo se debe tener en cuenta que la evolución de los patógenos debido a los cambios ofertados por el medio ambiente y el hombre obliga a mantener una estrategia basada en la diversidad de genes de resistencia.



### **3. OBJETIVO GENERAL:**

Identificar la importancia del gen SH3 y su relación con la resistencia a la enfermedad roya del cafeto *Hemileia vastatrix* bajo la modalidad de compilación bibliográfica.

#### **3.1. Objetivos específicos:**

3.1.1. Encontrar información bibliográfica relacionada a los genes responsables de la resistencia a *Hemileia vastatrix* en el cultivo de café.

3.1.2. Documentar la importancia del gen SH3, en la resistencia a la enfermedad *Hemileia vastatrix*.

#### 4. REVISION DE LITERATURA

El café es la segunda bebida más ingerida en el mundo después del agua, además de ser la segunda mercancía más comercializada en el mundo, en 2012 Brasil fue el mayor productor de café verde, seguido de Vietnam, Indonesia y Etiopía. Casi la totalidad de la producción mundial de café es obtenida en zonas tropicales y subtropicales, en su mayoría países en vías de desarrollo o subdesarrollados. En muchos casos la exportación de café constituye parte importante de los ingresos del país, y su producción un gran generador de empleo. De la producción del café no sólo depende un gran número de personas (25 millones en el mundo) sino también muchos países productores. Hay zonas alrededor de los grandes lagos de África (en Burundi, Ruanda o Uganda) que, a pesar de no figurar entre las principales zonas de exportación de café respecto al volumen mundial, su economía depende de un 80% de su exportación. En América, los principales exportadores de café son Brasil (primer exportador a nivel mundial), Colombia (quinto exportador a nivel mundial), México (séptimo exportador a nivel mundial), Honduras (octavo exportador a nivel mundial), Perú (noveno exportador a nivel mundial) y Guatemala (décimo exportador a nivel mundial), siendo la producción y exportación del Perú, una de las que más ha crecido en los últimos años a nivel mundial. En 1825, la producción mundial era de 100.000 toneladas y en 2001 fue de 6 millones. Desde 1997 hasta 2005, la producción ha aumentado un 20%, dos veces más que la demanda. La OIC estimó la producción global de café en 145,2 millones de bolsas para el año de cultivo 2012/2013 (desde octubre del 2012 a septiembre del 2013). (Departamento Económico y Parcial FAO, 2010).

El café es un producto básico cuyo precio internacional está sometido a muchas fuerzas y variables de mercado, financieras y climáticas. En el caso de Colombia, en lo que va de 2014 los precios han mostrado una recuperación, pues entre el 2 de enero y el 12 de febrero, el indicador compuesto de la Organización Internacional del Café (OIC) aumentó 23,1%, al pasar de 104,52 a 128,67 centavos de dólar por libra. En el caso del arábigo colombiano, la recuperación ha sido más notoria, pues este indicador ponderado de la OIC aumentó 25,9%, al pasar de 126,10 a 158,75 centavos de dólar por libra. Para los productores colombianos la FNC ofrece a todos los cafeteros la garantía de compra, para

el mes de Febrero de 2014 de \$ 711,000 por carga (125 Kg) de pergamino seco mediante la publicación de un precio base de mercado que se calcula de acuerdo con la cotización de cierre en la Bolsa de Nueva York del día, el precio del dólar del día y el diferencial o prima de referencia para el café colombiano. (Federación Nacional de Cafeteros, 2013).

El 70% del café que se consume en el mundo pertenece a la especie *Coffea arábica*, la cual se cultiva particularmente en América y en algunas regiones de África y Asia, en zonas altas. El 30% restante del consumo está representado por *Coffea Canephora* o café robusta, la cual por sus condiciones especiales es sembrada en África y se cultiva en zonas bajas. En Colombia, únicamente se cultivan los cafés arábigos los cuales producen una bebida suave, de mayor aceptación en el mercado mundial. Las variedades de café arábigo que se siembran en Colombia son: Típica también llamada arábigo, pajarito o nacional; Borbón; Tabi que es una variedad de grano grande, tiene una excelente calidad y es ideal para obtención de cafés especiales, variedad Colombia y Caturra). De acuerdo con el Censo Cafetero, realizado por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, alrededor de 563 municipios son productores de café en Colombia. El promedio por finca es alrededor de 1.5 hectáreas. El total de las hectáreas que se encuentran sembradas en café es de 869.157,9; 260.009 hectáreas en Café Típica, y 609.149,9 en Café Caturra y Variedad Colombia tecnificado. (Moreno R. 2.000).

Para garantizar que cada uno de los caficultores obtengan las cifras de producción del grano esperado, se debe iniciar con diferentes prácticas agronómicas, que se encaminen al mismo objetivo entre ellas la disciplina del mejoramiento genético, donde se establecen diferentes aspectos, como resistencia a enfermedades, en este caso la roya del cafeto la cual es una enfermedad limitante en cada una de las regiones donde se cultiva café. (Alvarado A.G. 2005).

Aspectos básicos para el mejoramiento genético en la especie:

- Adoptar la diversidad genética como estrategia general para el desarrollo de nuevas variedades, formando cultivares compuestos de *Coffea arabica* agronómicamente competitivos.

- Utilizar el Híbrido de Timor como fuente de resistencia completa e incompleta a la roya del cafeto, el cual además, es poseedor comprobado de tolerancia a la enfermedad de las cerezas del café (CBD).
- Usar variedades tradicionales como básicas para los cruzamientos con la finalidad de obtener cultivares de fácil aceptación entre los agricultores por sus excelentes atributos y adaptación a las condiciones de la zona cafetera.

#### **4.1. Taxonomía de la especie, (Monroig M.F. 2010):**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Subfamilia: Ixoroideae

Tribu: Coffeae

Género: *Coffea*

Especie: *Arabica*

#### **4.2. Grupo genético**

##### **4.2.1. Variedad caturra**

Es una mutación originada de un gen dominante del café Borbón en el estado Minas Gerais en Brasil. Es una planta de porte bajo (1.5 a 2 m), tronco grueso y poco ramificado e inflexible. Posee entrenudos muy cortos en las ramas y en el tallo lo que lo hacen un alto productor. Sus hojas son grandes, de borde ondulado, anchas, redondeadas, gruesas y de color verde oscuro. Las hojas nuevas son de color verde claro. Es un arbusto de un aspecto general compacto y de mucho vigor. Las ramas laterales forman un ángulo bien cerrado con el tronco. Su sistema radical está bien desarrollado lo que le permite adaptarse a diferentes condiciones. Es una variedad muy precoz y de alta

producción por lo que requiere un manejo adecuado. La calidad de la bebida es suave. (Monroig M.F. 2010 y Da Silva S.F et-al.2008).

Las condiciones ideales para el cultivo se encuentran entre los 1.200 y 1.800 metros sobre el nivel del mar. En Colombia, los cultivos del café se encuentran, en su gran mayoría, sobre las laderas de las tres cordilleras de los Andes (Oriental, Central y Occidental) y, en menor escala, en la Sierra Nevada de Santa Marta. Las zonas cafeteras colombianas están ubicadas en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cesar, Caquetá, Casanare, Cundinamarca, Guajira, Huila, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca. En estas regiones, se cuenta con el clima y las condiciones atmosféricas óptimas para el crecimiento de los cafetales. (Monroig, 2010).

#### **4.3 Biología floral**

La flor del cafeto se compone de un pequeño cáliz con cinco sépalos y cinco pétalos blancos, la parte inferior de estos se encuentra unida a la corola. La corola es cilíndrica y alargada, en ella se insertan los cinco estambres de anteras largas y filamentos cortos, se encuentra el estigma que es delgado y largo ramificado al final en dos, y en la parte inferior se encuentra el ovario dividido en dos cámaras cada una de las cuales contiene el ovulo.



**Figura 1: Flor de café: Fuente: Gutiérrez Z.G.1993 .Biología de *Coffea arabica*.**

*Coffea arabica* es una especie autofértil y tetraploide con  $2n = 4x = 44$  cromosomas, que puede desarrollar semillas y frutos cuando el polen es transferido a las anteras del estigma de la misma flor o de una distinta, pero de la misma planta teniendo en cuenta que los insectos son necesarios o útiles para llevar el polen al estigma. (Gutiérrez Z.G,1993).

Según Freitas (2004), la poliploidía, con frecuencia, tiene su origen en organismos diploides, a partir de errores en la primera etapa de la meiosis (Fallas de disyunción) dando lugar a la formación de gametos  $2n$ . Si una planta con tales gametos diploides se puede autofecundar dará origen a organismos  $4n$ . Estos organismos por autofecundación o por cruza entre hermanos pueden dejar establecida una población tetraploide, la cual probablemente estará aislada en términos reproductivos de la población parental, originando una nueva especie biológica. En este caso la población poliploide derivó de la misma especie, por un proceso de autopoliploidía, pero también es posible que se originen, mediante un proceso similar, por hibridación entre especies muy relacionadas filogenéticamente; caso en el cual el proceso es de alopoliploidía, siendo *Coffea arabica* la única especie del género *Coffea* tetraploide, esto significa que *C. arabica* tiene cuatro juegos de la serie básica de los cromosomas de género ( $n = 11$ ), por un total de 44 cromosomas, este es el caso de los híbridos resultantes de cruzamientos donde han sido ampliamente utilizados en el mejoramiento como el Híbrido de Timor, esta accesión de la especie *C. arabica* es el resultado del cruzamiento interespecífico y espontáneo entre *C. canephora* ( $2n = 2x = 22$ ) y *C. arabica* ( $2n = 4x = 44$ ).

Según Romero et-al., 2010, el café arábigo *Coffea arabica* L es una planta de tipo arbustivo, originaria de las regiones altas del África central, particularmente del Sureste de Etiopía y Norte de Kenia. Su origen parece ser el resultado de una hibridación natural entre dos formas ancestrales, próximas a las especies *C. eugenoides* y *C. canephora*. Producto de ese origen híbrido, el genoma actual de *C. arabica* está compuesto por dos subgenomas poco diferenciados, que le confieren su carácter de alopoliploide segmental, su comportamiento meiótico es regulado y de tipo disómico, lo que significa que

prevalece el apareamiento preferencial entre cromosomas homólogos. Aunque el género *Coffea* incluye más de 100 especies descritas, sólo dos de ellas, *C. canephora* y *C. arabica*, tienen una participación mayoritaria en el mercado mundial, con el 30% y 70% de la producción mundial, respectivamente. En Colombia, la especie tradicionalmente cultivada es *C. arabica*, la cual se distingue por la suavidad y calidad de su bebida, que le confieren un mayor valor comercial. Las variedades de café arábigo tradicionalmente cultivadas en el mundo, y particularmente en América, se caracterizan por una gran uniformidad genética, producto de varios factores, entre los cuales se cita su tipo de reproducción (preferencialmente autógeno) y el modo particular de dispersión, a partir de su centro de origen. Como consecuencia, dichas variedades muestran una gran susceptibilidad a las diferentes enfermedades y plagas que atacan el cultivo. Ante este panorama, a partir de la década de los 60 los programas de mejoramiento debieron recurrir a la incorporación de nuevos genes, particularmente relacionados con la resistencia a la roya del cafeto *Hemileia vastatrix*, derivados de forma directa (por cruzamientos interespecíficos), o indirecta (a través del Híbrido de Timor), de la especie diploide *C. canephora*.

En el escenario actual de la caficultura, en el cual juegan factores como los riesgos fitosanitarios potenciales, la necesidad de adaptación a ambientes específicos y las exigencias del mercado en cuanto a diferenciación por calidad de la bebida, hace cada vez más necesaria la introducción de nuevas características, en las variedades que se cultivarán en el mediano y largo plazo. Para alcanzar este objetivo es necesario recurrir a los bancos de germoplasma de café disponibles en el mundo, uno de los cuales se encuentra en Colombia bajo el cuidado de Cenicafe. Este recurso genético establecido en 1940, conocido como la Colección Colombiana de Café (CCC), posee actualmente más de 1.000 introducciones, entre las cuales se destacan las derivadas de la especie *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica*. (Levitus G. et-al. 2004 citado por Alzate 2014).

#### **4.4. Importancia de la roya del cafeto *Hemileia vastatrix*.**

La roya del cafeto es la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que esta enfermedad provoca la caída prematura

de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de los árboles (Moreno. R. et-al. 2000). Este patógeno tiene la siguiente clasificación taxonómica

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Phylum: Basidiomycota
- Subphylum: Pucciniomycotina
- Clase: Pucciniomycetes
- Orden: Puccionales
- Género: *Hemileia*
- Especie: *Hemileia vastatrix*

CABI (2013), menciona que el impacto económico de *H. vastatrix* en el cultivo del café no solo se debe a la reducción de la cantidad y la calidad de la producción, sino también a la necesidad de implementar costosas medidas de control en los cultivares susceptibles. En Brasil la no aplicación de medidas de manejo del patógeno condujo a una reducción del 30% en el rendimiento Sin embargo la implementación de una calendarización de aplicaciones de fungicidas en las zonas cafetaleras de este país tuvo un costo de 67 US\$/ha o 74 US\$m, lo cual representa el 9% del valor de las exportaciones de café de esta nación (Mónaco, 1977).

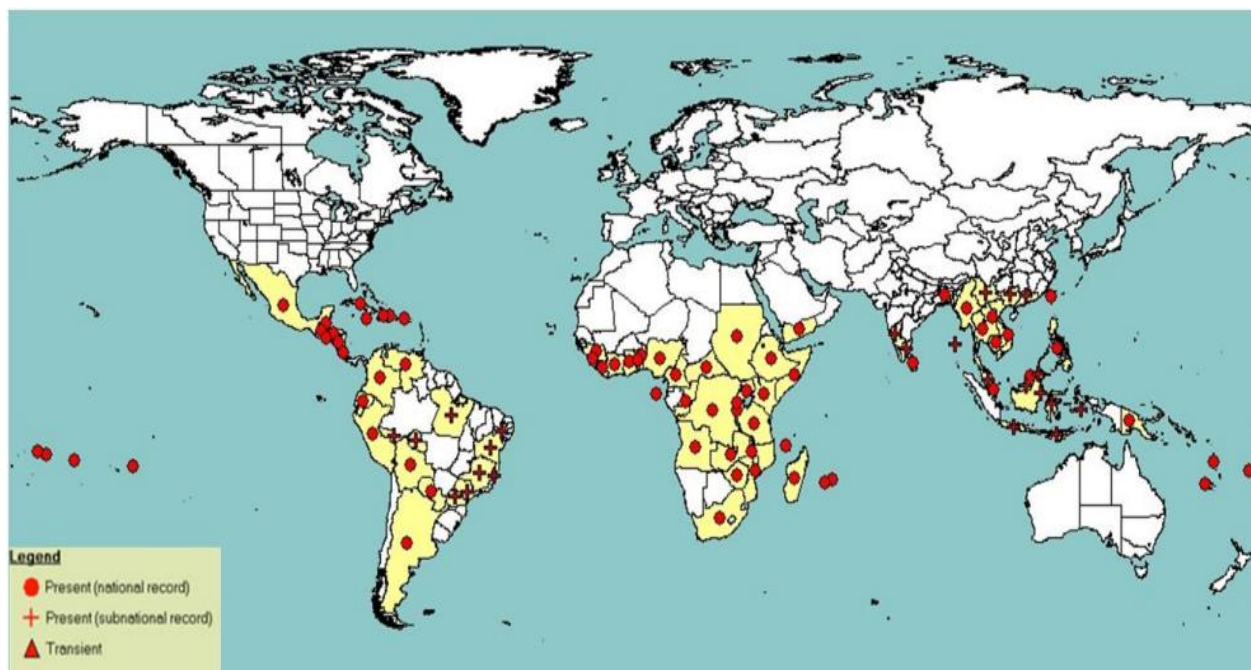
En 1983 se tuvo el primer registro de esta enfermedad en Colombia, con pérdidas de hasta un 30% en cultivos donde no se realizaron acciones de manejo. Recientemente, en el país, durante el período de 2008 a 2011, en algunas de las variedades comerciales susceptibles de las principales zonas cafetaleras del país, se presentó un inusual incremento en la incidencia de esta enfermedad, así como una mayor severidad en hojas infectadas (> 30%) (Cristancho et al., 2012).



#### 4.5. Distribución geográfica de la roya

En la tabla 1. Se observa la distribución a nivel mundial de la Roya.

Tabla 1. Distribución mundial de la roya descrita por continentes y países Fuente: Gonzales G.R. et-al. 2013. Ficha técnica roya del cafeto, <i>Hemileia vastatrix</i> Berkeley & Broome. Página 1-16.	
Asia	Bangladesh, Camboya, China, India, Indonesia, Laos, Malasia, Myanmar, Singapur, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia, Vietnam. Yemen.
África	Angola, Benín, Burundi, Camerón, Comoras, Congo, Costa de Marfil, Etiopía, Ghana, Guinea, Isla Reunión, Kenia, Liberia, Madagascar, Malawi, Mauritania, Mozambique, Nigeria, República Centroafricana, República Democrática del Congo, Ruanda, Santo Tomé y Príncipe, Sierra Leona, Somalia, Sudáfrica, Sudan, Tanzania, Togo, Uganda, Zambia y Zimbabue.
América	Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua, Paraguay, Perú, Puerto Rico, República Dominicana, Venezuela.
Oceanía	Islas Cook, Nueva Caledonia, Papúa Nueva Guinea, Polinesia Francesa, República de Fiyi, Samoa, Samoa Americana, Vanuatu.



**Figura 2: Distribución mundial de *H. vastatrix*: Fuente: Gonzales G.R. et-al. 2013. Ficha técnica roya del cafeto, *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Página 1-16.**

#### **4.6. Hospedante**

*H. vastatrix* ataca exclusivamente a diferentes especies del genero *Coffea spp.* como: *Coffea arabica*, *Coffea canephora* y *Coffea liberica*. es un parásito biotrófico que no ha sido posible cultivar in vitro, lo cual obliga al mantenimiento de aislamientos puros mediante ciclos continuos de inoculaciones en plantas susceptibles, que pueden afectar las características fenotípicas y genotípicas presentes en las poblaciones silvestres. (Escobar O., C.; Cristancho A., M.2007).

##### **4.6.1 Ciclo biológico de la enfermedad**

Según Rivillas et al., (2011) el proceso infectivo de la roya del cafeto comienza con los síntomas de la enfermedad que aparecen en el envés de las hojas, en donde se observan manchas pálidas que con el tiempo aumentan de tamaño y se unen formando las características manchas amarillas o naranja, con presencia de polvo fino amarillo, donde se producen las urediniosporas del hongo. La germinación de urediniospora requiere de

la presencia de agua libre por al menos 6 horas y también es favorecida con temperaturas entre 21-25 °C y condiciones de obscuridad. El apresorio para formarse requiere de un periodo de 5.3-8.5 horas. La germinación se inhibe por la luz y cuando se evapora el agua de la hoja, ya que afecta el crecimiento de los tubos germinativos. Sin embargo, luego de germinar, el hongo penetra en las hojas a través de los estomas en el envés de las hojas maduras (Rayner, 1961 y Corrales D.et-al 2014).

Una vez que ha penetrado al interior de la hoja, el hongo desarrolla unas estructuras denominadas haustorios, los cuales entran en contacto con las células de la planta y con éstos extraen los nutrientes para su crecimiento. Luego de transcurridos 30 días, después de la colonización, el hongo está lo suficientemente maduro como para diferenciarse en estructuras llamadas soros, que son las encargadas de producir nuevas urediniosporas. El tiempo transcurrido desde la infección hasta la producción de urediniosporas se denomina periodo de latencia. Para la zona cafetalera de Colombia, el periodo de latencia puede fluctuar entre 34 y 37 días al sol y entre 31 y 35 días a la sombra. Ver figura 3.

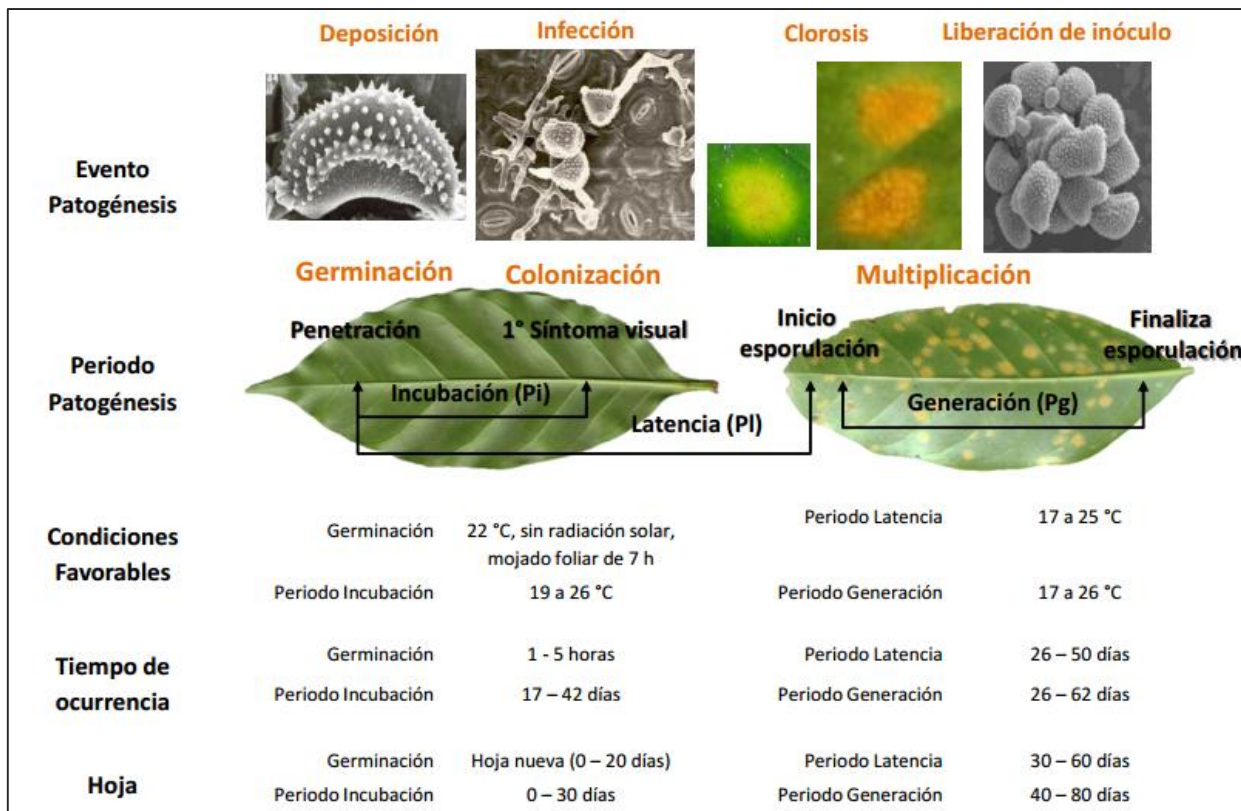
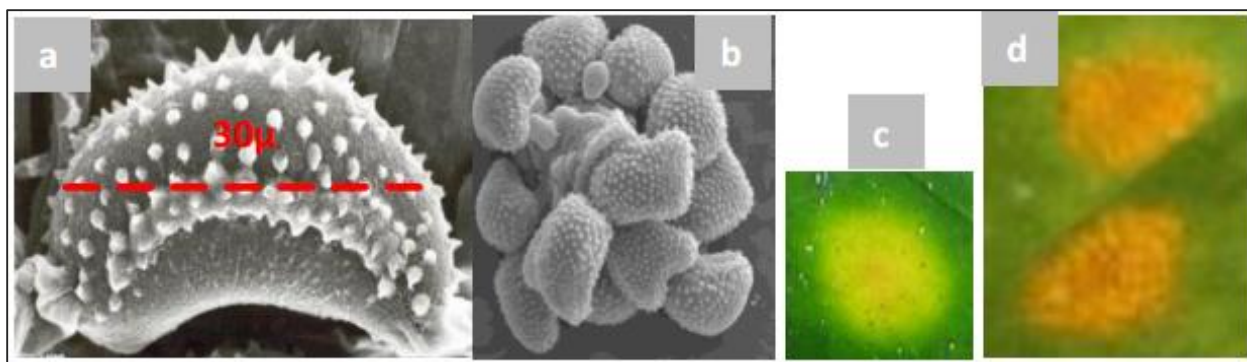


Figura 3: Ciclo biológico (patogénesis) de la roya del caféto *Hemileia vastatrix* Fuente: Gonzales G.R. et-al. 2013. Ficha técnica roya del caféto, *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Página 1-16.

#### 4.6.2 Descripción Morfológica

Según Gonzales G.R. et-al. 2013, las urediniosporas son de tamaño microscópico (30µ de largo X 20µ de ancho) de forma reniforme, lisas en la cara interna y rugosa en la externa, denominadas urediniosporas (reproducción asexual), que son producidas en grandes cantidades y corresponden al polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y que es característico de esta enfermedad. Las teliosporas (reproducción sexual), cuya ocurrencia es muy baja, son de forma redondeada de 20-25µ



**Figura 4:** a-b) Fotografía en microscopio de barrido correspondiente a las urediniosporas del hongo; c-d) acercamiento de los síntomas de la roya del cafeto (soros). Fuente: Gonzales G.R. et-al. 2013. Ficha técnica roya del cafeto, *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Página 1-16.

Según Gonzales G.R. et-al. 2013, describe que:

#### 4.6.3 Síntomas y Daños

Los síntomas inician como pequeñas manchas de 1-3 mm, translúcidas y de color amarillo claro. La lesión crece en tamaño y pueden coalescer con otras manchas, hasta formar grandes parches con abundante polvo amarillo (urediniospora) en el envés de las hojas (Figura 5) y que en su lado opuesto se observan como manchas amarillas. Las lesiones viejas se necrosan, pero la esporulación puede continuar en el margen de las lesión. Los daños severos, mayores al 60%, pueden causar defoliación. Si la infección ocurre en etapas tempranas se puede presentar una reducción en el rendimiento. Sin embargo, si la infección se presenta en etapas tardías el efecto se observará en los niveles de amarre de fruto del siguiente ciclo de cultivo.



**Figura 5: Síntomas *H. vastratix*. Afección de hoja Fuente: Gonzales G.R. et-al. 2013. Ficha técnica roya del cafeto, Hemileia vastatrix Berkeley & Broome. Página 1-16.**

#### **4.6.4. Aspectos Epidemiológicos**

*H. vastatrix* necesita condiciones particulares para parasitar las hojas de la planta de café. En especial, requiere de la salpicadura de la lluvia para iniciar su proceso de dispersión entre hojas y entre plantas, así como de la presencia de una capa de agua en el envés de las hojas para germinar, todo esto acompañado de temperaturas entre 16 y 18°C, en condiciones de baja intensidad luminosa.

#### **4.6.5. Sobrevivencia**

*H. vastatrix* es un parásito obligado y sobrevive únicamente en tejido vivo del hospedante, las urediniosporas pueden sobrevivir hasta por 6 semanas bajo condiciones ambientales secas. No se han reportado hospedantes alternos y no sobrevive en restos del cultivo.

#### **4.6.6. Dispersión**

Se lleva a cabo mediante las urediniosporas, las cuales son producidas en grandes cantidades y corresponden al polvo amarillo o naranja que se observa en el envés de las hojas. Entre los factores abióticos que favorecen la dispersión del hongo se encuentran el viento y la lluvia mediante el salpique. La dispersión local de hoja a hoja o entre plantas, sobre todo en altas densidades de plantación, es favorecida por el salpique del agua de

lluvia. A grandes distancias el viento juega el rol más importante al dispersar las urediniosporas entre regiones productoras de café. Adicionalmente, se ha reportado que algunos insectos como thrips, moscas y avispas, contribuyen en su dispersión, aunque en proporciones mínimas. La intervención humana podría estar involucrada en la dispersión a grandes distancias entre continentes y países.

#### **4.6.7 Multiplicación**

Posterior a 30 días después de la etapa de infección y colonización del tejido de las hojas, el hongo está lo suficientemente maduro como para diferenciarse en estructuras llamadas soros, que son las encargadas de producir nuevas urediniosporas. Aproximadamente de 1.600 urediniosporas por milímetro cuadrado (mm<sup>2</sup>) de hoja son producidas, durante un período de 4 a 5 meses, éstas son dispersas para iniciar el nuevo ciclo de infección. Para la zona cafetera de Colombia, el período de latencia puede fluctuar entre 34 y 37 días al sol y entre 31 y 35 días a la sombra. En investigaciones recientes realizadas por Cenicafé, en esos mismos lugares, se apreció el efecto de las variaciones climáticas de los últimos años sobre la roya, en particular sobre esos períodos de incubación y de latencia, los cuales transitoriamente sufren aumentos o disminuciones, comparados con los valores anteriores, dependiendo de las condiciones ambientales, como la temperatura en este caso. (Gonzales. et-al. 2013).

#### **4.6.8. El mejoramiento genético**

Es un conjunto de principios científicos, métodos, técnicas y estrategias aplicadas a la obtención de genotipos o grupos de genotipos con características deseables según objetivos previamente definidos. El proceso fundamental que subyace en el mejoramiento es el de cambio adaptativo por sustitución alélica bajo selección. La mutación, la hibridación interespecífica y la transgénesis pueden aportar nuevos caracteres a la diversidad de un cultivo, no obstante el proceso fundamental, luego que tales caracteres son incorporados al germoplasma, no se modifica. El mejoramiento genético es un proceso cíclico. En cada ciclo, se evalúan todos los individuos de una población determinada. Como resultado de esta evaluación, se seleccionan los individuos deseables y los restantes son descartados. Finalmente, los individuos selectos

se cruzan entre sí (se recombinan) para dar origen a una nueva generación en que se reinicia un nuevo ciclo. (Levitus, G. et-al, 2004 citado por Alzate, 2014).

Con base al argumento anterior un determinado carácter (como por ejemplo, resistencia a una enfermedad) el cual está gobernado por un solo gen con dos alelos, el alelo de resistencia es incompletamente dominante, el patógeno está siempre presente y las condiciones ambientales para que se produzca la infección son siempre favorables. Por lo tanto, si se observa una planta sin síntomas puede concluirse que la misma es homocigota para el alelo de resistencia. En forma similar, si se observa una planta muy afectada por la enfermedad se concluirá que la planta es homocigota para el alelo que confiere susceptibilidad, y todas las plantas que muestren fenotipos intermedios podrían considerarse heterocigotas. En este caso ideal, el fenotipo estaría indicando exactamente cuál es el genotipo de cada individuo, la correlación entre fenotipo y genotipo tendería a 1 y el desvío fenotípico tendería a cero. Bajo esas condiciones el progreso genético por elección sería máximo. Lamentablemente, en la práctica este tipo de ejemplo jamás ocurre. Los caracteres de importancia económica no siempre están gobernados por un único gen, sino por varios, y las relaciones de dominancia y de epistasis (interacción entre genes) suelen ser bastante complicadas. Así mismo, el patógeno puede o no estar presente, y el ambiente puede o no ser favorable para el desarrollo de la enfermedad. Por todas esas razones, la asociación entre fenotipo y genotipo es en general escasa, lo que hace que al evaluar individuos a través de su fenotipo no se esté seleccionando el genotipo adecuado y la recombinación incluirá muchas cruas entre individuos que no portan el o los genes deseados. El resultado es que el incremento de los alelos favorables dentro de la población se hace a tasas más lentas y, por ende, el progreso genético es mucho menor, por esta razón la tecnología de marcadores moleculares se puede aplicar para optimizar o hacer más eficiente todos y cada uno de los factores determinantes de la ganancia genética o del progreso genético por selección. Así, los marcadores moleculares pueden utilizarse para: Organizar, mantener e incrementar la diversidad genética. De este modo se verá incrementado el progreso genético. (Levitus G. et-al. 2004 citado por Alzate 2014).



## **4.7. Genética del café**

### **4.7.1. Identificación de genes responsables de enfermedades**

*C. arabica* está formado por la hibridación entre dos especies diploides cercanas *C. eugenioides* y *C. canephora* esta especie se caracteriza por su baja diversidad genética, la cual es atribuida a su biología reproductiva y al proceso evolutivo de las especies. La baja variabilidad se refleja en la susceptibilidad de la especie a la mayoría de las enfermedades. (Montoya O.G.E. et-al 2006). El género *Coffea* cuenta con 47.999 registros de ESTs (Expressed sequence tags) (Abril 2006), principalmente de secuencias de la especie *C. canephora*. Este tipo de proyectos permiten la caracterización de “sets” completos de transcritos de un organismo y son fuente de marcadores genéticos que pueden asociarse funcionalmente a características agronómicas de interés. Así, el uso de marcadores basados en ESTs puede conducir al mapeo genético de una secuencia blanco basada en la predicción de su función. En plantas, las genotecas de ADNc (ADN complementario) han permitido aislar y caracterizar clones que han contribuido a la construcción de mapas físicos y de ligamiento, al desarrollo de ESTs, así como también al estudio de los mecanismos de expresión de varias isoenzimas y varias familias de genes.

En Colombia de acuerdo a la FNC (Federación Nacional de Cafeteros), en cabeza de Cenicafe, el proyecto del genoma del café tiene como metas fundamentales: Conocer la localización de los genes de interés (resistencia a enfermedades y plagas, calidad de la bebida y rendimiento, entre otros), su secuencia (genómica estructural) y su función (genómica funcional). El aislamiento, caracterización y análisis de las secuencias de ADNc se obtienen de tejidos de *C. arabica* con el fin de investigar de manera global, el perfil de expresión génica del mismo. (Montoya et-al 2006).

Para determinar cada uno de los genes vinculados a este proceso según Álvarez et-al (2002) se debe realizar un Aislamiento de DNA que consiste en: (Ver figura 6)=

1. Licuar 10g de hojas frescas con 150ml de Buffer de extracción (350mM sorbitol, 100mM Tris, 5 mM EDTA, 0,2% Beta-mercaptoetanol, pH 8,2).



2. La mezcla se filtra a través de gasa y se centrifuga 4°C por 15 minutos a 650 x g.



3. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 5ml de buffer de extracción. La suspensión se coloca en un tubo de 50ml que contenía 2ml de sarcosil al 5%. Posteriormente se adicionan 5ml de buffer para lisis de núcleos (200 mM Tris, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB, pH 7,5).



4. La mezcla se incuba a 65°C por 1 hora. Se adiciona 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcla invirtiendo el tubo hasta obtener una emulsión



5. Una vez obtenida la emulsión, se centrifuga a 480xg durante 15 minutos y se recupera la fase acuosa en un tubo nuevo.



6. El DNA se precipita adicionando 1 volumen de isopropanol frío. Se centrifuga a 650xg durante 15 minutos. Posteriormente el DNA se lavó con 500 ml de etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente.



7. Finalmente se resuspende en 500 ml de buffer TE 10/1 (10 mM Tris-Cl pH 8,0 y 1 mM EDTA pH 8,0). La purificación del DNA de alto peso molecular se realiza mediante centrifugación en equilibrio con gradientes continuos de cloruro de cesio-bromuro de etidio. (Álvarez, M.E.L; 2002).



**Figura 6. Aislamiento de ADN Fuente: Curso Biotecnología II. Actividad 8. Pag. 5, Alzate 2013.**

#### 4.7.2. Mejoramiento genético de café y la importancia de la variedad caturra

El género *Coffea* tiene como ventaja la posibilidad de obtener híbridos interespecíficos entre la mayoría de especies que lo conforman, lo cual sugiere que todas ellas comparten un mismo genoma de base, producto de un origen monofilético. El primer paso en la incorporación o “introgresión” de nuevos genes en la especie cultivada *C. arabica*, es: Información ya que es la base para diseñar estrategias de utilización adecuadas, que permitan una introgresión exitosa de una o varias características de interés. En Colombia, se han realizado varios intentos de introgresión de genes mediante la producción de híbridos triploides, los cuales una vez logran regular su fertilidad, pueden ser incorporados en una estrategia de mejoramiento genético. Es así como a principios de 1970, la disciplina de Mejoramiento Genético de Cenicafe inició un programa de hibridación interespecífica entre las especies *C. arabica* y *C. canephora*, que dio como resultado un número importante de líneas, con excelentes características agronómicas y elevada resistencia a la roya. (Romero et-al 2010).

Dentro de las muchas especies diploides de interés potencial para el mejoramiento de *C. arabica* están *C. eugenoides* y *C. liberica*. La primera de ellas guarda una relación filogenética estrecha con *C. arabica* dada su posible participación como ancestro materno; adicionalmente, posee elevada tolerancia a condiciones desfavorables de suelo y bajos contenidos de cafeína en el grano (0,2%), lo cual la hace interesante desde el punto de vista del mejoramiento de la calidad. La especie *C. liberica*, por su parte, muestra un alto contenido de ácidos clorogénicos en sus granos, que juegan un papel importante en la producción de aromas en la bebida. Además de su reconocida resistencia a la roya, *C. liberica* se caracteriza por poseer tolerancia a bajas temperaturas y un sistema radical vigoroso, que la hace tolerante al ataque de nematodos. Finalmente, los estudios recientes muestran que esta especie parece tener un efecto de antibiosis, en respuesta al ataque de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), que se traduce en una reducción significativa en la oviposición del insecto en el grano. Dada su importancia y la potencial utilidad para el programa de mejoramiento genético del café. (Romero et-al 2010).

#### **4.7.3. Heredabilidad de la resistencia y tipo.**

De acuerdo a Vanderplank (1984), todas las plantas tienen un cierto nivel de resistencia no específica, pero no siempre la misma, que es eficaz contra un cierto número de sus patógenos. Este tipo de resistencia a veces se denomina como resistencia no específica, general, cuantitativa, de planta adulta, de campo o durable, pero se conoce más comúnmente como resistencia horizontal.

La resistencia horizontal está bajo el control de muchos genes, de ahí el nombre de resistencia poligénica. Cada uno de estos genes por separado es ineficaz para contrarrestar el efecto del patógeno y puede tener una función menor en la resistencia total de la planta (resistencia de genes menores). La resistencia horizontal que muestra una variedad vegetal ante todas las razas de un patógeno puede ser algo mayor (o menor) que la mostrada por otras variedades ante ese mismo patógeno, pero las diferencias por lo común son pequeñas e insuficientes para poder distinguir las variedades según su nivel de resistencia horizontal (resistencia no diferencial). Además la resistencia horizontal es afectada por diferentes condiciones ambientales, bajo las cuales también puede variar. En general, la resistencia horizontal no evita que las plantas sean infectadas, sino que retarda el desarrollo de cada uno de los lugares de infección en la planta y por lo tanto retrasa la propagación de la enfermedad y el desarrollo de las epifitas en el campo.

La pérdida de la resistencia en materiales antes libres de la enfermedad se observó inicialmente en cafetales en Java e India, a finales del siglo XIX y principios del XX. Desde 1930, Mayne en estudios desarrollados en café, sugirió la existencia de interacciones entre razas del patógeno y variedades del huésped, hipótesis que se corroboró posteriormente por los trabajos en lino, desarrollados por Flor en 1956 donde afirma que la coexistencia que existe entre las plantas huésped y sus patógenos en la naturaleza indica que ambos han evolucionado juntos. Dicha evolución gradual, de resistencia y virulencia, puede explicarse por medio del concepto de gen a gen, de acuerdo con el

cual, por cada gen que confiere resistencia en el huésped, hay un gen correspondiente en el patógeno que le confiere virulencia y viceversa.

Según Romero et-al 2008, el uso de la resistencia genética en café *Coffea sp* para el manejo de la enfermedad en Colombia se basa en un esquema de diversidad genética. El recurso genético más ampliamente utilizado como donante de la resistencia ha sido el Híbrido de Timor, derivado de un cruzamiento interespecífico natural entre *C. arabica* y *C. canephora*, hallado en la isla de Timor. A partir del Híbrido de Timor por cruzamiento con variedades locales de *C. arabica* de amplia adaptación y aceptación, en diferentes países, se han obtenido genotipos con características agronómicas sobresalientes y atributos de resistencia. En Colombia, Cenicafe desarrolló las variedades Colombia, Tabi, y posteriormente, la Variedad Castillo y sus derivadas de uso regional.

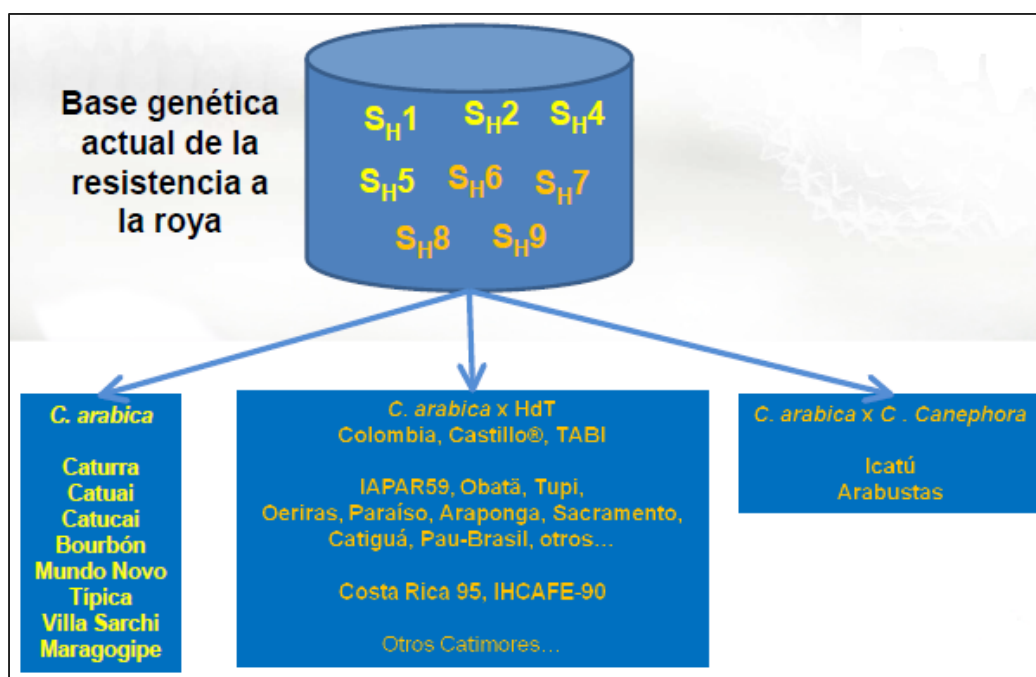
#### **4.8. Genes ligados a la resistencia de *Hemileia vastatrix* cultivo del cafeto (Gen SH3)**

##### **4.8.1. Genes involucrados en la resistencia**

Según Hiroshi S.G. et-al 2007, recientemente, las razas de roya se han identificado con gran espectro de virulencia, como la raza **XXXIX**, con ocho genes de virulencia (v 1,2, 4, 5, 6, 7, 8, 9), aislado a partir de muestras de la India, en este contexto, se han identificado diferentes fuentes de resistencia a la enfermedad, con nueve genes dominantes (SH1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y SH9) presentes en forma aislada o en combinación, este argumento comprueba la teoría de flor 1956, donde afirma: La coexistencia que existe entre las plantas huésped y sus patógenos en la naturaleza indica que ambos han evolucionado juntos. Dicha evolución gradual, de resistencia y virulencia, puede explicarse por medio del concepto de gen a gen (Ruas A. E. et-al 2013).

Los genes de resistencia identificados en *C. canephora* (SH6 la SH9) y *C. liberica* (SH3) han proporcionado resistencia con durabilidad significativa en varias regiones que han sido probados. Para la transferencia de estos genes a cultivares de *C. arabica* donde han sido hibridados como el Timor híbrido y equipos indios.

Las razas fisiológicas de la roya de la hoja ya tenían derrotado casi todos los genes de resistencia a SH. Muchos cultivares de café considerados resistentes en el pasado, ahora presentaban susceptibilidad. Para un cultivo perenne como el café, donde un cultivar necesita rendimiento, vida útil de al menos 15 años, la resistencia duradera a roya de la hoja es muy importante para ser un exitoso cultivo. Los genes de resistencia SH1, SH2 y SH4, solos o en combinaciones, no han proporcionado resistencia duradera. El gen SH3 y ciertos genes de *C. canephora* como del "Híbrido de Timor" e "Icatu" puede ser más eficiente para obtener resistencia duradera, sobre todo cuando es utilizado en combinaciones (García B.F.A. 2012). Según Hiroshi S.G. et-al (2007) informó de que el gen SH2 no le confiere resistencia a la enfermedad, por lo tanto, cuando los cafés con este gen se inocularon con razas que llevan el gen de virulencia v2, se produce una alta susceptibilidad. Los genotipos de los cafés con genes SH1 y SH4 presentan menos resistencia a la enfermedad en el campo sin estos genes, si son expuestos a las razas con los genes v1 y v4, respectivamente. A continuación se puede observar los genes involucrados SH presentes en diferentes especies del género *Coffea*, y sus cruzamientos.



**Figura 7. Origen de la resistencia genética contra la roya en variedades comerciales de café (*C. arabica* L.). Fuente: Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando, 2011.**

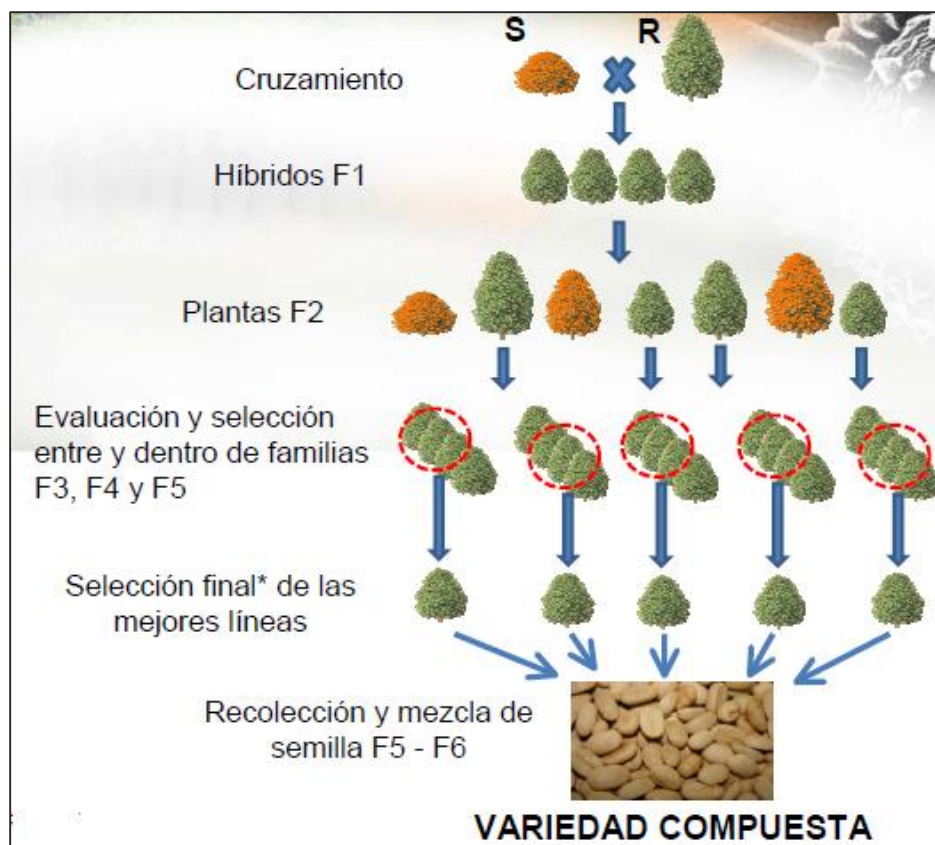
Sin embargo, esto puede ser debido a la menor presencia de genes presentes en estos genotipos. Las variedades con el gen SH3 han demostrado diferentes niveles de resistencia, lo que indica la gran importancia de este gen (Ver figura 8):

CIFC's coffees	Resistance genes	Resistance groups	Scores of rust incidence	Resistance reaction
128/2 – Dilla and Alghe *	S <sub>H</sub> 1	A	5	Susceptible
849/1 – Matari *	S <sub>H</sub> ?	B	5	Susceptible
Bourbon	S <sub>H</sub> 5	E	5	Susceptible
134/4 – S12 Kaffa	S <sub>H</sub> 1, S <sub>H</sub> 4	I	3	Susceptible
87/1 – Geisha	S <sub>H</sub> 1, S <sub>H</sub> 5	C	3	Susceptible
32/1 – DK 1/6 *	S <sub>H</sub> 2, S <sub>H</sub> 5	D	5	Susceptible
33/1 – S 288-23 *	S <sub>H</sub> 3, S <sub>H</sub> 5	G	2	<b>Resistant</b>
110/5 – S4 Agaro	S <sub>H</sub> 4, S <sub>H</sub> 5	J	4	Susceptible
H420/2 *	S <sub>H</sub> 5, S <sub>H</sub> 8	2	4	Susceptible
1006/10 – KP 532 (pl 31)	S <sub>H</sub> 1, S <sub>H</sub> 2, S <sub>H</sub> 5	L	5	Susceptible
H153/2	S <sub>H</sub> 1, S <sub>H</sub> 3, S <sub>H</sub> 5	Z	2	<b>Resistant</b>
635/3 – S12 Kaffa	S <sub>H</sub> 1, S <sub>H</sub> 4, S <sub>H</sub> 5	W	4	Susceptible
H152/3	S <sub>H</sub> 2, S <sub>H</sub> 4, S <sub>H</sub> 5	Y	3	Susceptible
H151/1	S <sub>H</sub> 3, S <sub>H</sub> 4, S <sub>H</sub> 5	X	1	<b>Resistant</b>
H419/20 *	S <sub>H</sub> 5, S <sub>H</sub> 6, S <sub>H</sub> 9	3	1	<b>Resistant</b>
HW17/12	S <sub>H</sub> 1, S <sub>H</sub> 2, S <sub>H</sub> 4, S <sub>H</sub> 5	O	3	Susceptible
H147/1	S <sub>H</sub> 2, S <sub>H</sub> 3, S <sub>H</sub> 4, S <sub>H</sub> 5	T	1	<b>Resistant</b>
H420/10 *	S <sub>H</sub> 5, S <sub>H</sub> 6, S <sub>H</sub> 7, S <sub>H</sub> 9	1	1	<b>Resistant</b>
644/18 – Híbrido Kawisari *	S <sub>H</sub> ?	M	3	Susceptible
832/2 – Híbrido de Timor	S <sub>H</sub> 5, S <sub>H</sub> 6, S <sub>H</sub> 7, S <sub>H</sub> 8, S <sub>H</sub> 9, S <sub>H</sub> ?	A	1	<b>Resistant</b>
832/1 – Híbrido de Timor	S <sub>H</sub> 5, S <sub>H</sub> 6, S <sub>H</sub> 7, S <sub>H</sub> 8, S <sub>H</sub> 9, S <sub>H</sub> ?	A	1	<b>Resistant</b>

**Figura 8: Niveles de resistencia de los genes SH. Fuente: Hiroshi S.G. et-al 2007. Resistance to Leaf Rust in Coffee Carrying SH3 Gene and others SH Genes. Vol. 50: pp 753-757.**

Según Gonzales et-al 2009, aunque se ha hecho un gran esfuerzo para obtener variedades con resistencia durable contra la roya, la continua aparición de nuevas razas del hongo, ha hecho difícil esta tarea para los mejoradores. La experiencia muestra que los genes de resistencia presentes en *C. arabica*, usados solos o en combinación, no garantizan una resistencia durable contra la enfermedad; sin embargo, cuando estos genes son usados en combinación con aquellos derivados de las especies diploides, *C. canephora* y *C. liberica*, el resultado es una resistencia más durable y efectiva. Por lo tanto, la acumulación de genes de resistencia en un solo genotipo (método conocido como **piramidización**) o el uso de líneas con diferentes combinaciones de estos genes, en variedades compuestas, parecen la mejor opción para para lograr una **resistencia verdaderamente durable** contra la roya del café. Ver figura 9.





**Figura 9. Proceso de obtención de las variedades compuestas en Colombia. Fuente: Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando, 2011.**

En Colombia, por ejemplo, el uso de una variedad compuesta como la variedad Colombia, ha permitido mantener una elevada resistencia contra la roya por más de 25 años. Tanto esta variedad como las variedades liberadas posteriormente (Tabi y Variedad Castillo), poseen un fondo genético derivado del híbrido de Timor. Si bien el monitoreo y ajuste constante de la resistencia exhibida por las líneas que componen estas variedades ha permitido mantener una resistencia elevada contra la enfermedad, la aparición cada vez más frecuente de razas compatibles con los derivados de este híbrido, hace necesario pensar en incorporar otras fuentes de resistencia. En este contexto, la adición de un nuevo gen como el SH3, derivado de *C. liberica*, es sin duda una alternativa promisorio.

De acuerdo con los estudios genético iniciados en los años 60 en el centro de investigación de las royas del café en Portugal (CIFC), la resistencia del café a la roya,



está condicionada por al menos a 9 factores o genes dominantes denominados (SH1 a SH9) que puede presentarse solos o en combinación. De estos factores de resistencia SH1, SH2, SH4 y SH5 han sido encontrados en *C. arabica*; los otros SH6, SH7, SH8 y SH9, han sido introducidos de la especie diploide *Coffea canephora* a través del híbrido de timor, mientras que el factor SH3 proviene de otra especie diploide *Coffea liberica*. Estos estudios han dejado igualmente en evidencia la continua aparición de nuevas razas de roya, es así como hasta 2004 se había reportado 45 razas del hongo, 20 de las cuales presentaban alta virulencia sobre diferentes accesiones del híbrido de timor, hasta ahora la única fuente de genes de resistencia de las variedades cultivadas en América. (Gonzales. 2009 Y Getrude O. et-al 2014).

La acumulación de genes de resistencia en un solo genotipo (Método conocido como piramidización) o el uso de líneas con diferentes combinaciones de estos genes, en variedades compuestas parecen la mejor manera para lograr una resistencia verdaderamente durable contra la roya del cafeto. La introgresión progresiva de diferentes genes de resistencia en una sola variedad usando métodos convencionales de mejoramiento puede ser una estrategia engorrosa debido a la presencia de genes ya existentes que tienden a enmascarar los genes introducidos (Epistasis), haciendo más difícil la selección. Adicionalmente estos métodos requieren de largos y costosos ensayos de campo a fin de seleccionar el fenotipo de resistencia buscado. Por lo tanto, recurrir a estrategias que hagan más efectiva la selección se convierte en un objetivo prioritario. Razón por la cual es necesario emplear la selección asistida por marcadores MAS (Siglas en ingles), es un método que facilita la selección precoz de los genotipos, acelerando el proceso de selección mientras asegura la presencia de los genes deseados (Ver figura 11). Esto es posible gracias a la identificación de marcadores moleculares íntimamente ligados a genes de interés. La utilidad de la MAS ha sido ampliamente probada en cultivos de arroz, maíz y trigo. (Según Rey O.A.M. 2013).

La introgresión progresiva de diferentes genes de resistencia en una sola variedad usando métodos convencionales de mejoramiento, puede ser una estrategia difícil debido a la presencia de genes ya existentes, que tienden a enmascarar los genes

introducidos (fenómeno conocido como epistasia), haciendo más difícil la selección (Ver figura 10).

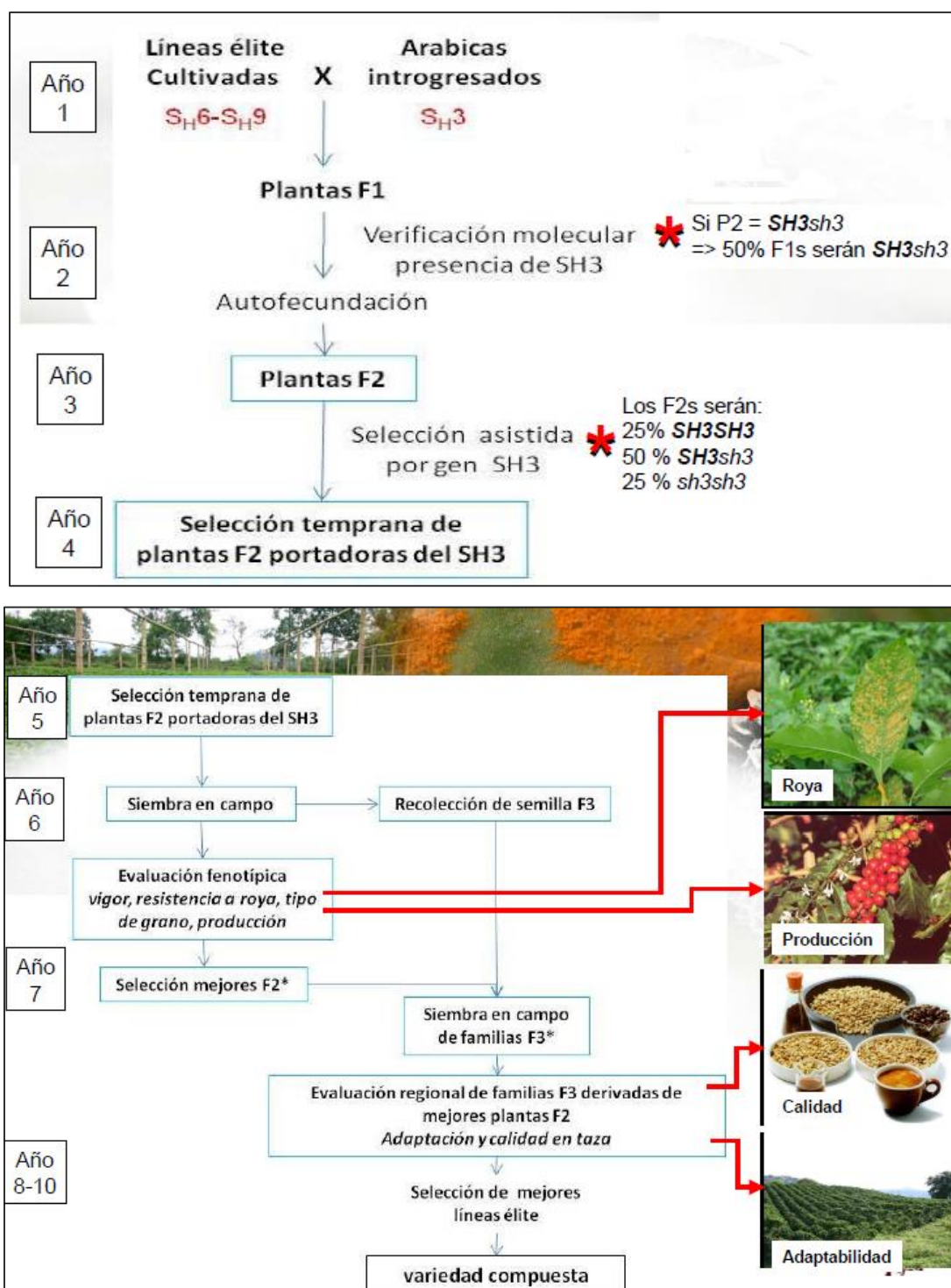
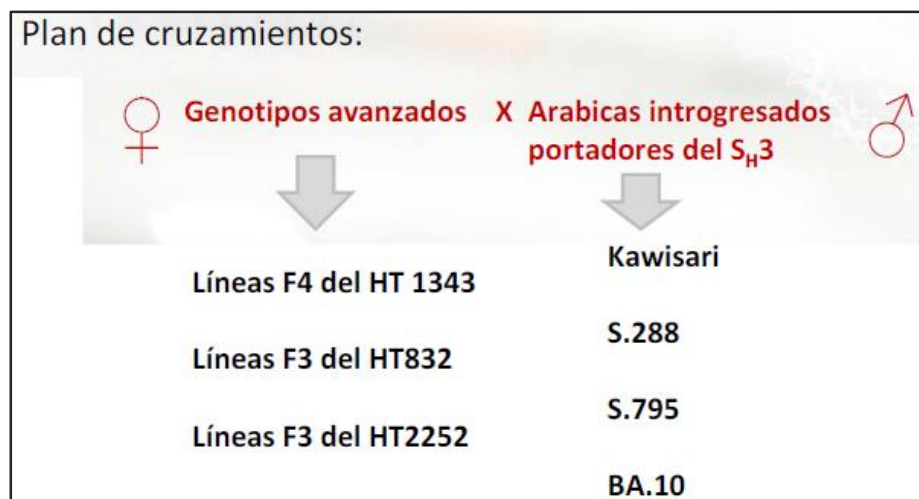


Figura 10. Obtención de poblaciones. Fuente: Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando, 2011,

La obtención del gen SH3 sería bajo el modelo de Arabicas introgresados portadores del gen SH3 (Kawisari, S.288, S.795, BA.10) x genotipos avanzados= Líneas H.T (Hibrido de Timor) F3 y F4. (Ver figura 11).



**Figura 11. Introgresión del gen SH3, Fuente: Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando, 2011.**

Por medio de validación de marcadores se establece que de los 10 marcadores evaluados solo 2 (Sat244 y BA-124-12K-f) permitieron determinar en forma clara y repetible la presencia del gen SH3. Adicionalmente Sat244 distingue posibles variaciones alélicas de este gen, tanto en la especie *C. liberica* como en materiales arábigos introducidos en ella. La presencia de estos marcadores correspondió muy bien con la reacción de resistencia a roya lo que sugiere que las razas compatibles con este gen de resistencia no existen o encuentran en muy baja frecuencia en nuestro medio. Adicionalmente la caracterización de diferentes accesiones de la CCC usando los marcadores seleccionados, mostró su bondad para identificar individuos “fuera de tipo” (No portadores del gen SH3), lo que ratifica la resistencia del gen a la enfermedad. (Gonzales L.F. 2009 y Ruas A. E. et-al 2013).

Recientemente Mahe (2008) y colaboradores identificaron 10 marcadores moleculares estrechamente al gen SH3 de resistencia a la roya. Estos marcadores derivados de una caracterización molecular detallada de la región genómica portadora de dicho gen, han abierto por primera vez la posibilidad de utilizar la selección asistida en el mejoramiento del café arábigo. Por esta razón se hace indispensable validar el grupo de los 10

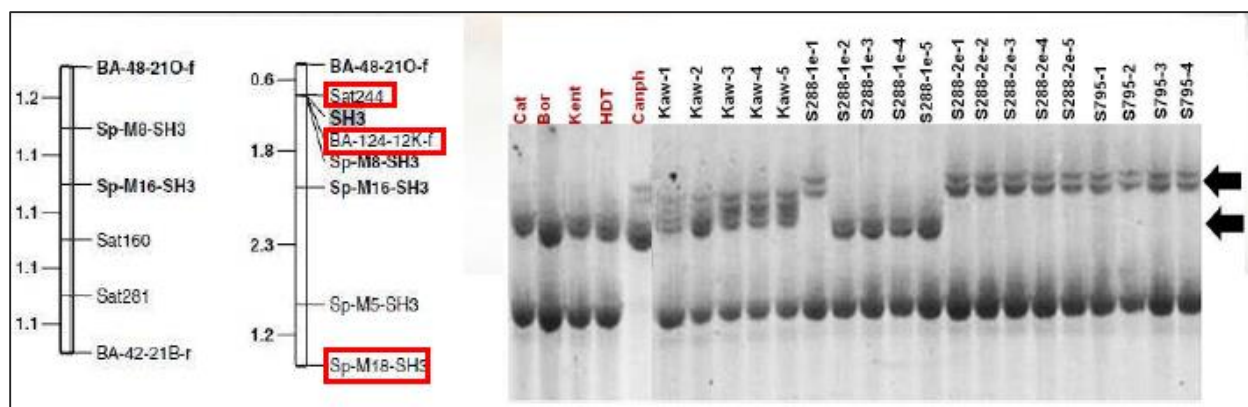
marcadores con el fin de determinar cuáles de ellos pueden ser de utilidad para asistir la selección de genotipos portadores del gen SH3. (Ver figura 12): Donde se evidencia la presencia-ausencia de los marcadores moleculares ligados al gen SH3 de resistencia a roya para el grupo de genotipos “no portadores del SH3” y el grupo de individuos “portadores del SH3”. La presencia de variaciones alélicas relacionadas con este gen se muestra con uno o varios asteriscos asociados al marcador respectivo.

		Marcador				
	Código	Banda presente				Banda ausente
		Sp-M18-SH3	Sat244	BA-48-210-f	BA-124-12K-f	Sat 160
No portadores del $S_H3$	Cat	0	0	0	0	1
	Bor	0	0	0	0	1*
	Caneph	0	0	0	0	1
	Kent	0	0	0	0	1*
	HDT	0	0	0	0	1**
Portadores del $S_H3$	Lib -769	1	1	1*	1	0
	Lib araw-1025	1*	1*	1*	1	1*
	Lib -abe1024	1*	0	1*	1	1**
	Lib -exc 1026	0	1**	0	1	1
	Lib -exc 1027	0	0	0	1	0
	Lib -exc 1028	0	1*	0	1	1*
	Lib -exc-26	1	0	0	1	1**
	Lib -araw -2	1	1*	1**	1	1**

**Figura 12: Grupo de individuos “portadores del SH3”. Fuente: 19. Gonzales M.L.F. 2009 Validación de marcadores moleculares ligados al gen SH3 de resistencia contra la roya en introducciones de la colección Colombiana del Café. Volumen 60. Página 366-380.**

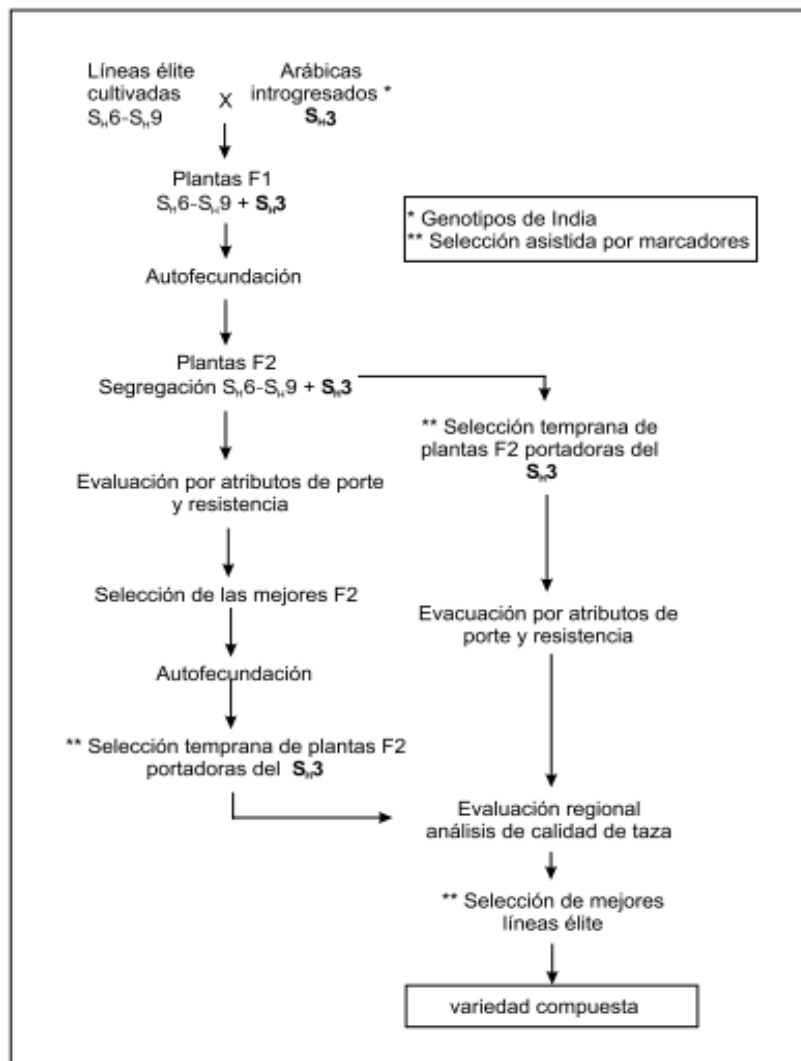
Según Hiroshi S.G. et-al 2007 los marcadores Sat244 y BA-124-12K-f, permiten determinar en forma clara y repetible la presencia del gen SH 3. Adicionalmente, el Sat244 distingue posibles variaciones alélicas del gen, tanto en la especie *C. liberica* como en materiales arábigos introgresados por ella. La presencia de estos marcadores corresponde muy bien con la reacción de resistencia a la roya, lo que sugiere que las razas compatibles con este gen de resistencia no existen o se encuentran en muy baja frecuencia, en nuestro medio. Adicionalmente, la caracterización de diferentes accesiones de la CCC usando los marcadores seleccionados, muestra su bondad para identificar individuos “fuera de tipo” (no portadores del gen SH3), que hacen parte de la

colección y que eventualmente podrían eliminarse, contribuyendo así a su depuración (De Brito G. et-al 2010).



**Figura 13. Seguimiento del gen SH3. Fuente: Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando, 2011.**

Finalmente, dada la confiabilidad de los marcadores seleccionados en el estudio, es posible prever su utilización dentro de una estrategia de selección asistida que busque la piramidización del gen SH3 sobre las líneas Laetitia Mahe et-al en el 2007. (Ver figura 14):



**Figura 14 Pirimidización del gen SH3. Fuente: Gonzales G.R. et-al. 2013. Ficha técnica roya del cafeto, *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Página 1-16.**

Según Ribas et-al 2011, la mayoría de los genes de resistencia a enfermedades (R) en las plantas codifican proteínas NBS-LRR y pertenecen a una de las familias más grandes y más variable de genes entre los genomas vegetales. Sin embargo, las rutas evolutivas específicas de los genes que codifican NBS-LRR continúan siendo difíciles de alcanzar.

Según Zambolim L et-al 2005, el análisis de secuencias de la región SH3 en tres genomas de café, *Coffea canephora* (Cc), *C. arabica* (sub-genoma E<sup>a</sup> y sub-genoma C<sup>a</sup>.) revela la presencia de 5, 3 y 4 genes R en los genomas de Ea, Ca, y Cc,

respectivamente. Todas estas secuencias R-genes parecen ser miembros de una familia de genes CC-NBS-LRR (CNL) que sólo se encuentra en el locus SH3 en *C. arabica*. Además, si bien se encontraran homólogos en varias especies dicotiledóneas, el análisis genómico comparativo, fracasa en encontrar el gen CNL R en las regiones ortólogas de otras especies dicotiledóneas. La relación ortológica entre las copias SH3-CNL en los tres genomas analizados se puede observar y los eventos de duplicación / deleción que dieron forma al locus SH3 pueden ser rastreados, además se detectan eventos de conversión génica entre parálogos en los tres genomas y también entre las dos sub-genomas de *C. arabica*. Se detecta selección positiva significativa en los residuos de disolvente expuestos de las copias SH3-CNL.

De acuerdo a Ribas et-al 2011, citado por Alzate 2014, en particular, el gen de resistencia (factor de resistencia  $S_H3$ ) ha sido insertado con éxito de *C. liberica* en cultivares agronómicamente importantes de Arábica. En los últimos años, los mapas genéticos y físicos del locus  $S_H3$  fueron terminados. Además, el uso de la fluorescencia *in situ* hibridación en *C. arabica*, en el locus  $S_H3$  se encuentra en una posición distal en un cromosoma que pertenece al grupo homeologous 1. Recientemente, una región de 800 kb que abarcan el locus  $S_H3$  fue secuenciado y anotado. Se identificaron genes CNL R sugiriendo que el locus  $S_H3$  corresponde a un clúster de varios complejos de genes. Las secuencias de un total de 13 clones BAC que abarcan el locus  $S_H3$  (Figura 15) en tres genomas de café (es decir,  $E^a$ ,  $C^a$  y un sub-genoma de *C. arabica* y  $C^c$  de *C. canephora*), han sido examinadas para la presencia de genes-R utilizando la anotación determinado previamente. Dependiendo del genoma en cuestión ( $E^a$ ,  $C^a$ ,  $C^c$ ), se identifican un total de 5, 3 y 4 genes-R, respectivamente.

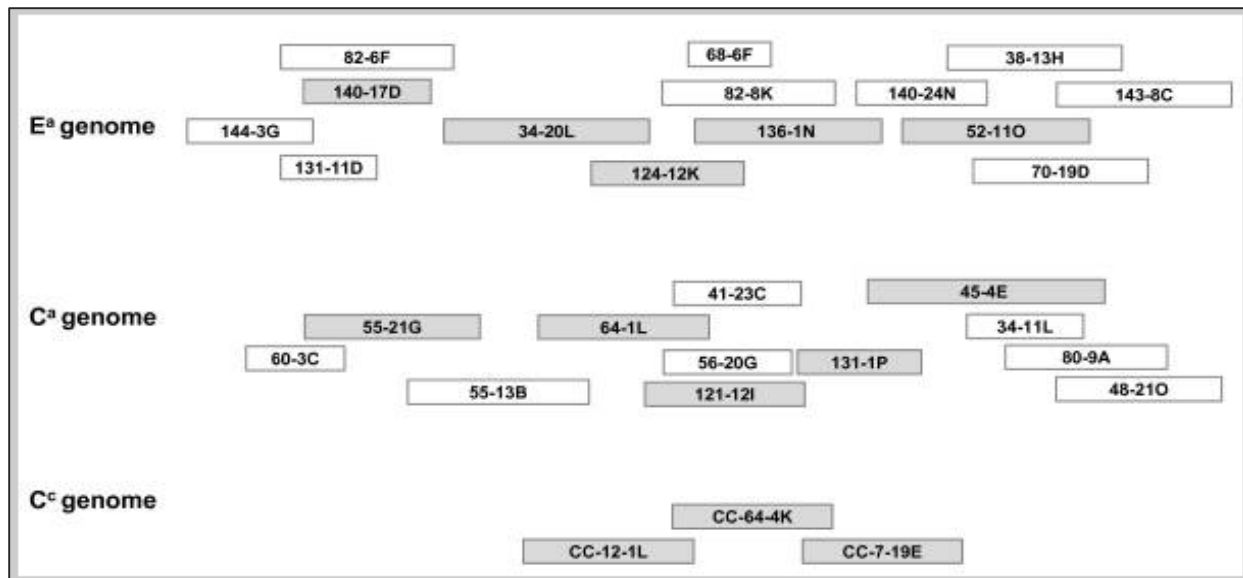


Figura 15: Secuencias de tres genomas de café. Fuente: Organization and molecular evolution of a group of genes for resistance to diseases in coffee plants. BMC Genomics. 2011; 12: 240. Publicado en Internet el 16 de mayo 2011

La organización observada de este locus es anterior a la divergencia entre los linajes de *C. eugenioides* y *C. canephora*. El escenario más parsimonioso de la evolución de este locus se ilustra en la figura 12, dos duplicaciones en tándem y varias supresiones forma la región A, mientras que un caso de la duplicación/inserción lejano da a luz a la  $S_H 3$ -CNL miembro(s) en la región B, además se puede observar la organización actual del locus  $S_H 3$  en *Coffea canephora* ( $C^c$ ) y *C. arabica* (sub-genoma  $E^{una}$  y sub-genoma  $C^a$ ). (Ver fig. 16 y 17). Ribas et-al 2011.

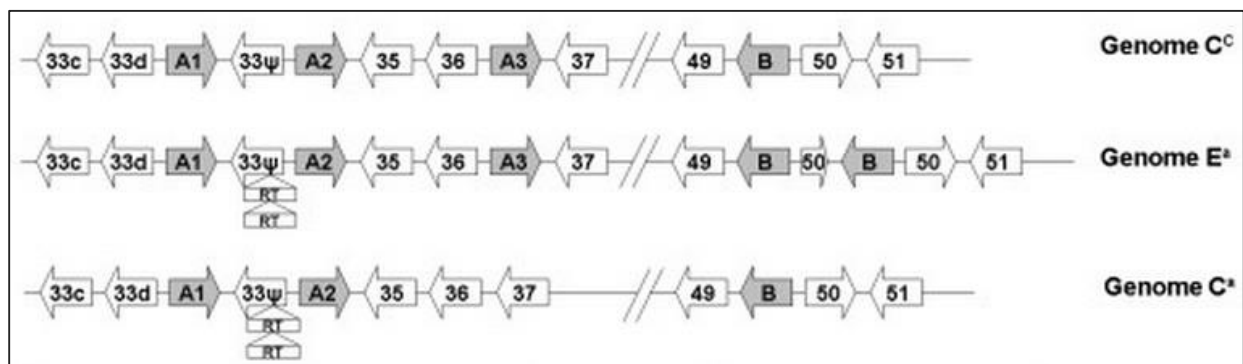


Figura 16: Evolución del locus SH3 en especies de café. Organización actual del locus SH3 en *Coffea canephora* ( $C^c$ ) y *C. arabica* (sub-genoma  $E^a$  y sub-genoma  $C^a$ ). Fuente: Organization and



molecular evolution of a group of genes for resistance to diseases in coffee plants. BMC Genomics. 2011; 12: 240.Publicado en Internet el 16 de mayo 2011

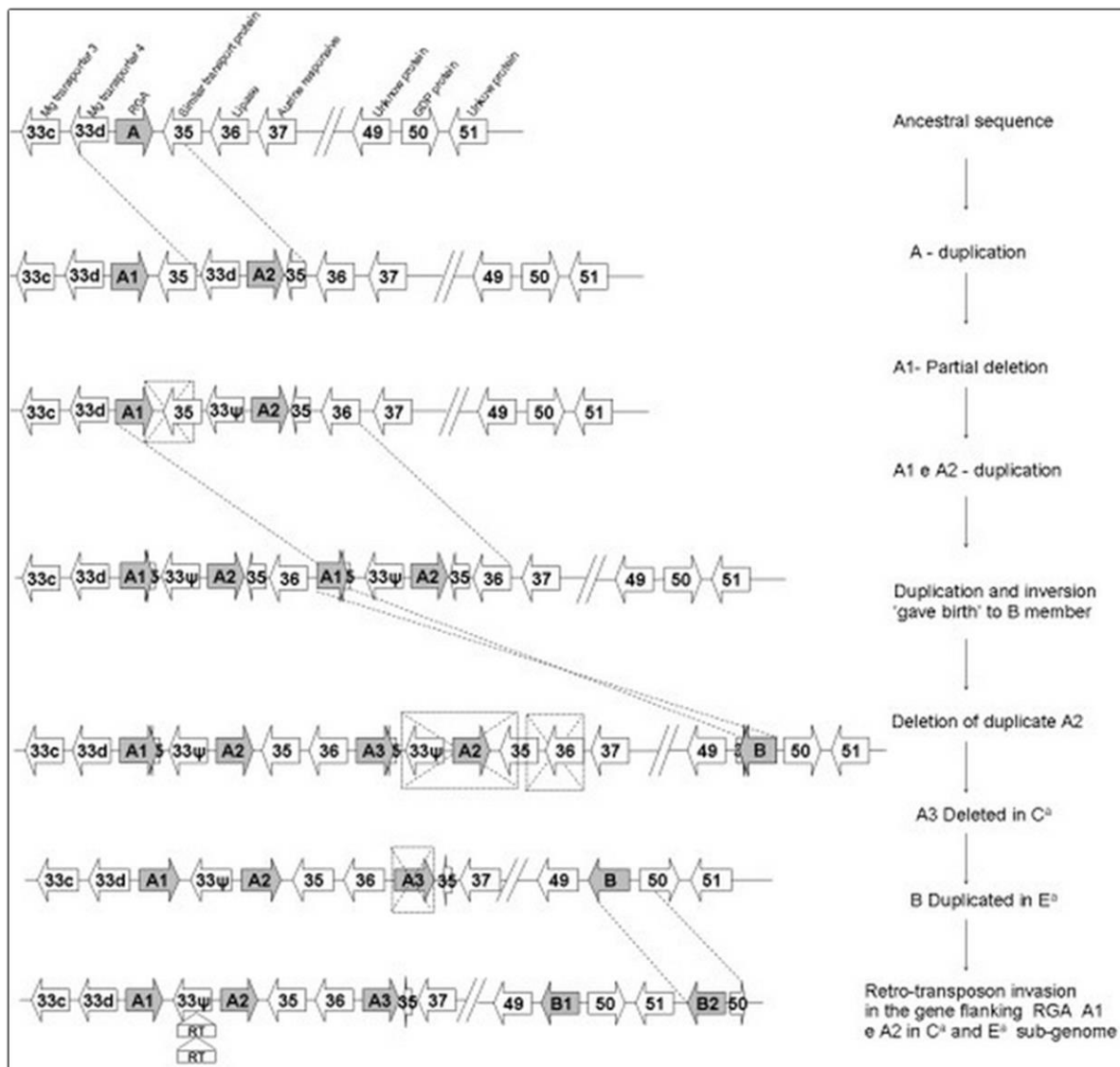


Figura 17: Evolución del locus SH3 en especies de café. Un modelo de la evolución del locus SH3 en las plantas de café que implican la expansión y retracción del genoma por duplicación de genes y supresiones. Las flechas grises indican miembros de la familia SH3. Las flechas abiertas indican otros genes no-R que flanquean los genes R en el locus. Flechas cortas indican versiones truncadas de los genes correspondientes. Fuente: Organization and molecular evolution of a group of genes for resistance to diseases in coffee plants. BMC Genomics. 2011; 12: 240.Publicado en Internet el 16 de mayo 2011.

#### 4.8.2 Caracterización de secuencias de la familia SH3 –CNL

De acuerdo a Ribas et-al 2011, la secuencia de codificación de todos los  $S_H3$  miembros-CNL se compone de dos exones separados por un intrón que van desde 157 hasta 272 nucleótidos de longitud. El primer exón abarca 1.042 nt (nt= 2 nucleótidos), mientras que el segundo exón se extiende desde 1703 hasta 2003 nt. La secuencia de la proteína se extiende desde 915 hasta 1015 aa (aa= Aminoácidos). La proteína de la alineación de secuencias de los miembros-CNL identificados 12  $S_H3$  (ocho de *C. arabica* y cuatro de *C. canephora*) se muestra en la figura.  $S_H3$ -CNL\_A2\_C<sup>un</sup> es utilizado como consulta para anotar los dominios de proteínas. BLASTP análisis contra la base de datos Pfam quien predice un dominio NBS entre las posiciones 173 y 465 aa, mientras que el análisis de la base de datos de dominio conservadas predice el comienzo de la región LRR en la posición 625 aa de la proteína de la consulta. Análisis BOBINAS revela una región espiral de la bobina situada entre la posición 17 y 56 bis, lo que confirma que esta familia pertenece a la subfamilia CC de genes NBS-LRR (o sub-familia no TIR). La región LRR de todos los genes se compone de 12 repeticiones que van del 23 al 31 aa. Estas repeticiones son suficientemente diferentes para garantizar una alineación inequívoca de las secuencias de amino-ácidos. A 8 deleciones pb modificaron el marco de lectura de B2\_E<sup>un</sup> e indujeron un codón de parada temprano después de la décima LRR; del mismo modo, una inserción de 1 pb en el A2\_E. (Ver figura 18).

Copia	genoma	El exón 1	INTRON	El exón 2	Proteína (aa)
A <sub>1</sub>	E <sup>un</sup>	1042	272	1787	943
A <sub>1</sub>	C <sup>una</sup>	1042	255	1787	943
A <sub>1</sub>	C <sup>c</sup>	1042	270	1898	980
Un <sub>2</sub>	E <sup>un</sup>	1042	270	1908	955
Un <sub>2</sub>	C <sup>una</sup>	1042	270	1820	954
Un <sub>2</sub>	C <sup>c</sup>	1042	269	1823	954
Un <sub>3</sub>	E <sup>un</sup>	1042	268	2003	1015
Un <sub>3</sub>	C <sup>c</sup>	1042	256	1865	969
B <sub>1</sub>	E <sup>un</sup>	1042	258	1865	969
B <sub>2</sub>	E <sup>un</sup>	1042	157	1703	915
B	C <sup>una</sup>	1042	260	1895	970
B	C <sup>c</sup>	1042	260	1874	972

**Figura 18: Exon e intrón tamaño (bp) y el tamaño de la proteína (aa) de los miembros SH3 -CNL.**  
**Fuente: Ribas Alessandra F , Alberto Cenci , Marie-Christine Combes , Hervé Etienne, Philippe Lashermes, Organization and molecular evolution of a group of genes for resistance to diseases in coffee plants. BMC Genomics. 2011; 12: 240.**

Según Ribas et-al 2011, los análisis comparativos de las agrupaciones génicas R, a través de diferentes especies demostraron que la evolución de los genes resistentes son un proceso dinámico que implica principalmente la duplicación, la supresión, cambio de secuencia, punto de mutación, selección diversificada, la recombinación, la conversión génica y la inserción. La disposición de conjunto de genes-R representa un importante reservorio de diversidad y una fuente de variación genética que permite la generación de nuevas especificidades de resistencia a través de la conversión de genes, la duplicación de genes, el sobrecruzamiento desigual, la recombinación ectópico o diversificación de la selección.

Para explorar la organización y para caracterizar los mecanismos implicados en la evolución del locus SH3, donde se identifica un grupo: Gen putativo R, una secuencia de ~ 550 kb es analizada en tres genomas de café. El análisis de secuencia revela la presencia de un número variable de genes NBS-LRR pertenecientes a la subclase CC en el locus SH3. Todos estos genes pertenecen a la misma familia (denominada en lo

sucesivo familia SH3-CNL). El análisis de secuencia de las regiones que flanquean los genes SH3-CNL ayudando a determinar la relación entre la ortología y las copias en diferentes genomas. Al mismo tiempo, varios rastros de antigua duplicaciones hacen posible rastrear los eventos de duplicación / delección que fueron coherentes con el modelo de nacimiento y muerte evolución, dando forma al locus SH3 desde el ancestro común más reciente de todos los ejemplares SH3-CNL. Puesto que la estructura del locus SH3 es bien conservada en los tres genomas de *Coffea* analizados, se puede concluir que el origen de la mayoría de las copias SH3-CNL es anterior a la divergencia entre las especies de *Coffea*. Los homólogos de genes SH3-CNL son encontrados en varias especies dicotiledóneas incluyendo *Solanum spp.*, Pero la genómica comparativa no lograron encontrar un gen R-CNL en las regiones ortólogos de tres especies diferentes. (Ribas et-al.,2011).

La inestabilidad estructural inducida por elementos móviles repetitivos es uno de los mecanismos que podrían conducir a la diversificación en las familias de genes R. La presencia de secuencias muy similares aumenta las posibilidades de mal emparejamiento durante la recombinación, dando lugar a cruces desiguales y conversiones de genes entre locus. Sin embargo, los bordes de las duplicaciones implicados en el nacimiento de nuevas copias SH3-CNL no estaban relacionados con elementos móviles y elementos móviles identificados en la región no parecen jugar un papel en la evolución estructural del locus SH3 de especies de *Coffea*. La conversión génica (es decir, la sustitución de una porción de una secuencia génica por la secuencia homóloga de otro gen relacionado) es más frecuente entre los miembros de familias muy similares, estrechamente agrupadas. La conversión génica es un fenómeno común y se ha detectado entre parálogos en muchos de estos grupos de genes R. Intercambios de secuencia entre diferentes sub-genomas han sido previamente detectado en un clúster de genes de resistencia R1 de una subfamilia CNL en *allohexaploid, Solanum demissum*. (Ribas et-al 2011).

Se detectaron eventos de conversión entre los miembros SH3-CNL independientemente de su orientación (es decir, entre los miembros en la región A y B). La orientación

invertida de los loci podría permitir la conversión de genes entre locus raros o intercambio desigual y reducir al mínimo el riesgo de reordenamiento cromosómico bruto. La selección natural influye en la evolución molecular de las secuencias mediante el aumento o la reducción de la probabilidad de fijación de una mutación dada que, respectivamente, aumenta o reduce la aptitud de los individuos que lo lleva. El efecto de la selección natural en una secuencia de genes puede ser investigada mediante el análisis de sustituciones de nucleótidos que se produjeron entre dos variantes de este gen. Como se supone que es sinónimo sustituciones (es decir, sustituciones de nucleótidos que no cambian la secuencia de aminoácidos) para no modificar el fenotipo, su acumulación se considera no ser influenciado por la selección natural. Las sustituciones al contrario, no son sinónimos (sustituciones de nucleótidos que modifican el aminoácido codificado) podría aumentar, reducir, o no influir en el estado físico de los individuos portadores de la misma; en consecuencia, su acumulación puede estar influenciado por la selección natural. En la carrera de co-evolutiva de armamentos entre los anfitriones y sus patógenos, genes implicados en su interacción se espera que evolucionar bajo la selección positiva. La selección positiva detectada en el residuo de disolvente expuesta de los miembros SH3-CNL podría indicar la participación en el reconocimiento de ataque de patógenos. (Ribas et-al 2011).

Según Herrera et-al., 2007, la hibridación fluorescente in situ (FISH) es utilizada para estudiar la presencia de cromatina extranjera en brids de alta-interespecificidad y una línea de introgresión (S.288) derivada de los cruces entre el cultivo de especies *Coffea arabica* y parientes diploides *C. canephora* y *C. liberica*. La hibridación in situ utilizando ADN genómico de *C. canephora* y *C. arabica* como sondas de hibridación cruzada mostraron elevada a lo largo del genoma híbrido, confirmando la diferenciación débil entre genomas parentales. Según los datos de hibridación in situ de (GISH), la semejanza genómica observada entre el moderno genoma *C. canephora* (C) y el derivado de subgenome *C. canephora* de *C. arabica* (Ca) aparece en lugar considerable. Existe pobre discriminación entre C y Ca cromosomas lo que apoya la idea de bajas modificaciones estructurales de ambos genomas desde la especiación de *C. arabica*, al menos en la frecuencia y distribución de secuencias repetitivas. GISH también se utilizó

para identificar los segmentos de la cromatina exóicas en el cromosoma diferencial de una línea de introgresión *C. liberica* de *C. arabica*. Además, el uso de GISH junto con el análisis BAC-FISH arroja una valiosa información adicional sobre la localización física de los fragmentos *C. liberica* que llevan el factor de SH3 implicado en la resistencia a la roya de la hoja del café (Ver figura 19).

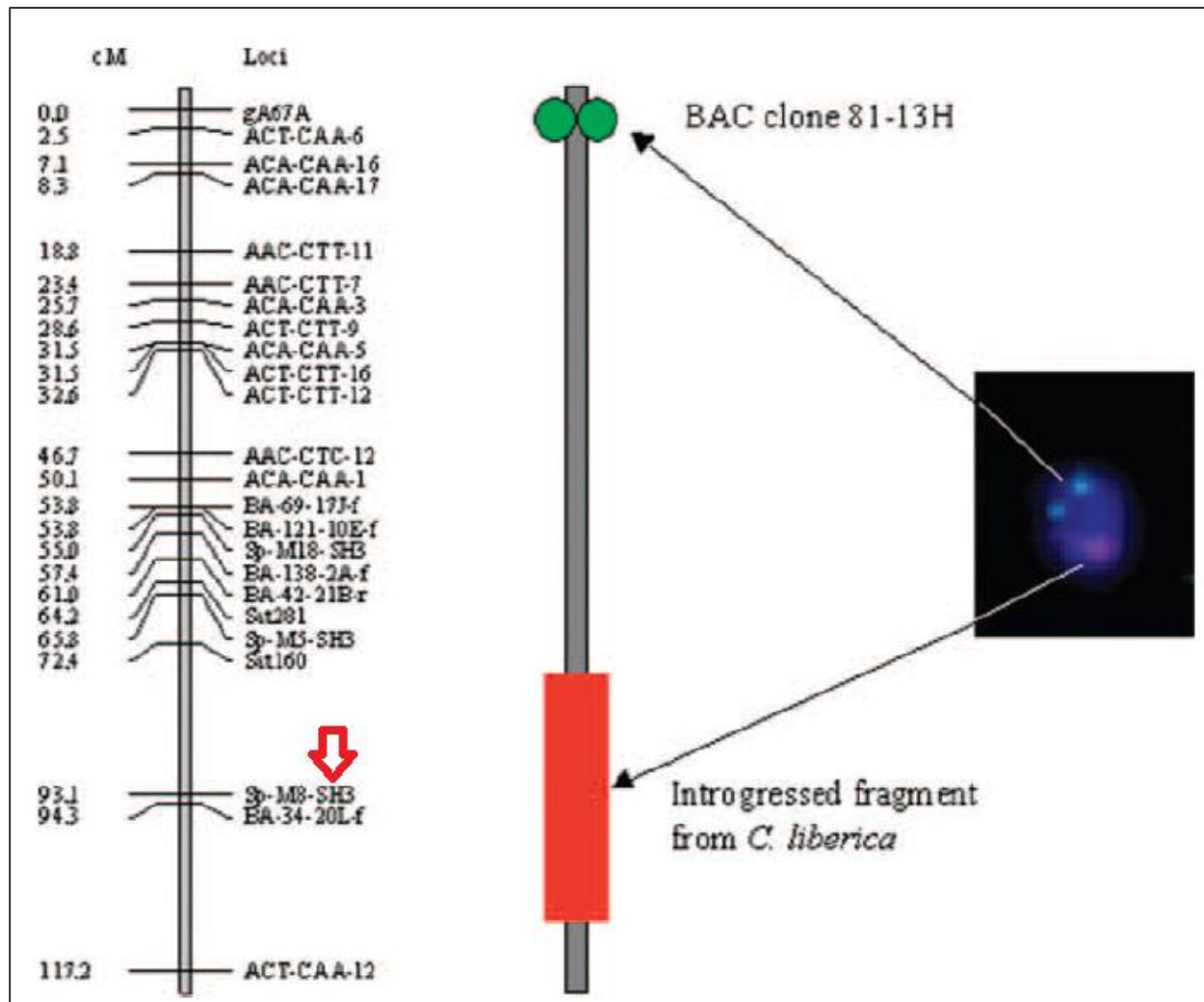


Figura 19: Comparación entre los mapas genéticos del cromosoma (centro) que incluye el clon BAC 81-13H (señal en verde), citogenética (izquierda), y el fragmento de introgresión que lleva el factor de SH3 de *C. liberica* (señal en rojo). Las distancias genéticas entre loci marcador se indican en centimorgans (cM). Fuente: Use of fluorescence in situ hybridization as a tool for introgression analysis and chromosome identification in coffee (*Coffea arabica* L.). Volumen 50. Pag. 619-626.

#### 4.8.3. Razas de roya

Según Cristancho et-al 2012, el patógeno *H. vastatrix* tiene una dependencia total de la planta de café, debido a que este género es el único hospedero conocido, y sólo puede alimentarse de células vivas de la hoja para crecer y reproducirse. La capacidad de realizar este parasitismo depende de una compleja interacción entre estos dos organismos, de manera que para que una infección sea exitosa y culmine en enfermedad, el hongo debe desactivar señales químicas propias y así pasar desapercibido a los mecanismos de resistencia que tenga la planta (Figura 20).

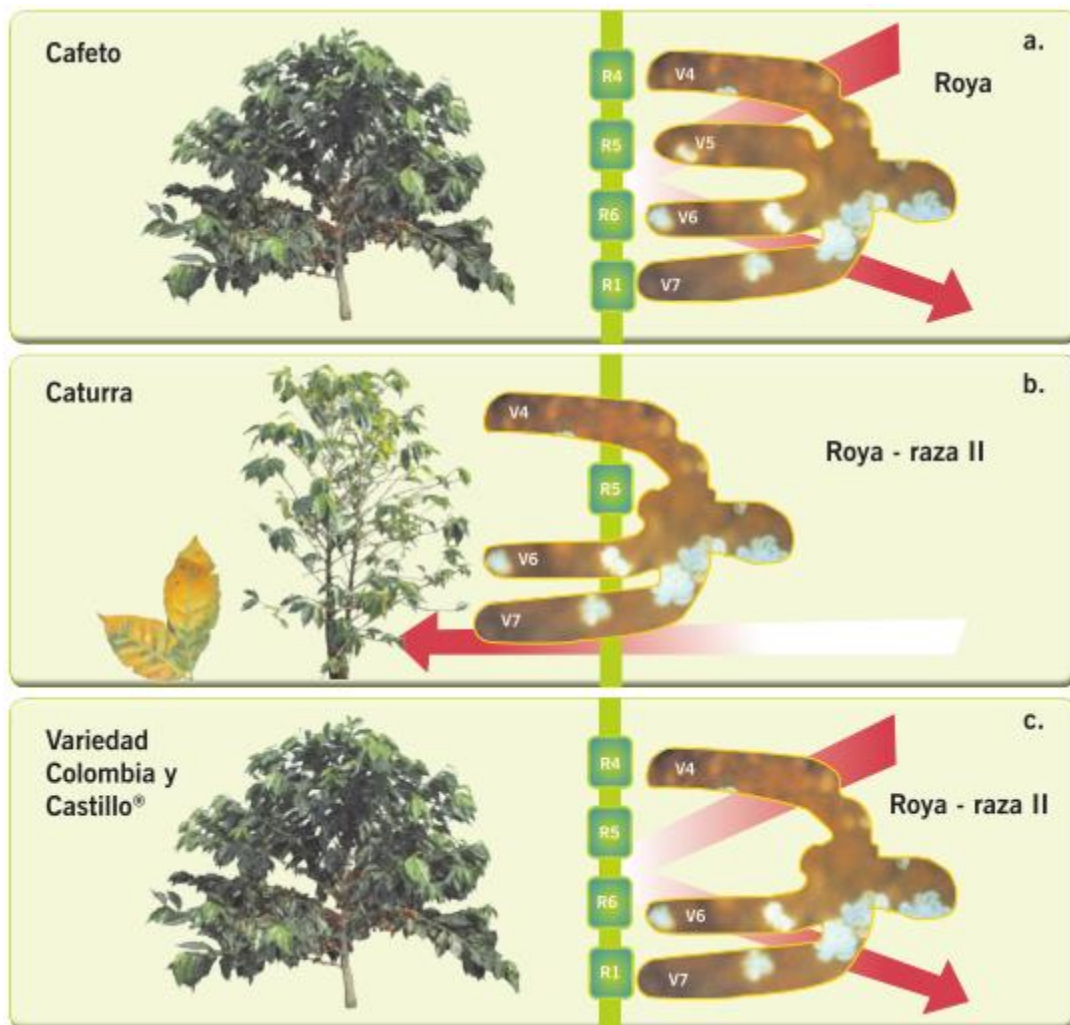


Figura 20: Analogía de la interacción *Hemileia vastatrix*-Café. a. El hongo presenta varios genes de avirulencia (V) que delatan su presencia si son detectados por los correspondientes genes de

resistencia (R) presentes en café; b. En el caso de la var. Caturra, sólo posee el gen de resistencia 5, que no puede detectar al correspondiente gen de avirulencia 5 de la raza II, pues ésta no lo tiene, dando como resultado la aparición de la enfermedad; c. En las var. Colombia y Castillo, existen varios genes de resistencia que pueden detectar la presencia del patógeno y generan una reacción de resistencia. Fuente: Cristancho, M. A., Rozo Y., Escobar C., Rivillas O.C.A, Gaitan B.A.L, 2012. Razas de Roya, epidemias del 2008 al 2011. Pag 3.

Para el caso de la roya del cafeto, hasta el momento se reconocen al menos nueve señales del patógeno, denominadas genes de avirulencia, que son detectadas por otros nueve mecanismos en el hospedero, conocidos como genes de resistencia. Las diversas combinaciones de los genes de avirulencia que pueda tener un aislamiento de *H. vastatrix* determinan el rango de posibles genotipos de café donde pueden causar la enfermedad. A estos aislamientos del hongo con combinaciones específicas se les conoce como Razas Fisiológicas. Por su parte, a los genotipos de café con diferentes combinaciones conocidas de genes de resistencia se les denomina Diferenciales. La raza más sencilla y que tiene mayor dispersión en todo el mundo es la raza II, que carece del gen de avirulencia 5. (Leguizamón C et-al 1984). Esta raza solo puede atacar a plantas de café que aunque tengan el gen de resistencia SH5, carezcan de todos los demás genes de resistencia. En este grupo se encuentran la mayoría de las variedades tradicionales cultivadas de la especie *Coffea arabica*, incluyendo Caturra, Típica, Mokka, Geisha, Pacamara y Maragogipe. Debido a procesos evolutivos, la raza II puede perder otros genes de avirulencia, generar una nueva raza y ampliar así su rango de acción sobre diversos genotipos de café. El principal mecanismo para la aparición de las razas es la mutación, que puede ocurrir por fenómenos como la exposición a la luz ultravioleta. El segundo factor es la alta cantidad de urediniosporas que produce el hongo durante su ciclo infeccioso, generando la probabilidad de aparición de nuevas variantes, con cambios en los genes de avirulencia. Es de recordar que en un período de entre 4 y 5 meses, en el envés de la hoja, una sola pústula de roya puede producir 1.600 urediniosporas por milímetro cuadrado (mm<sup>2</sup>), y como la enfermedad es policíclica, lo cual significa que en el transcurso de un período del cultivo se presentan varios ciclos de infección y reproducción que pueden sobreponerse, el resultado es un alto número de

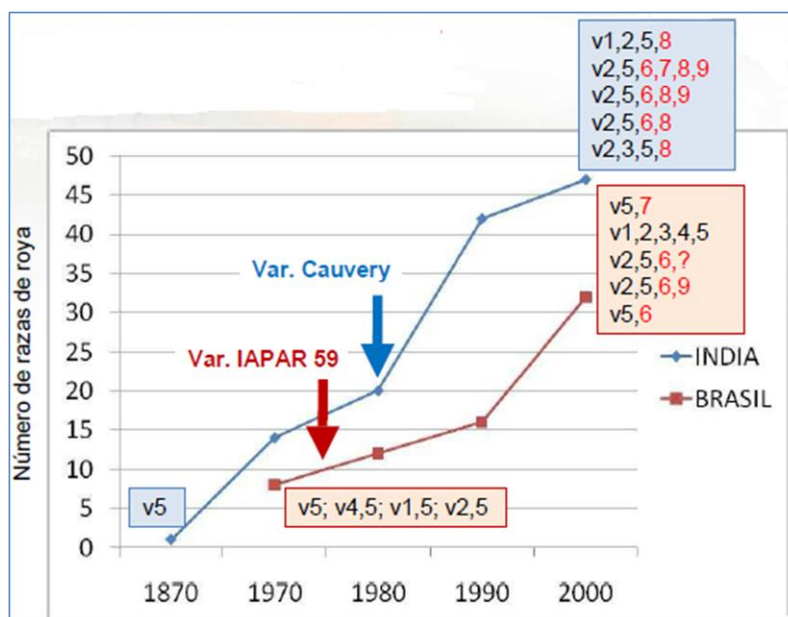


urediniosporas por lote. Finalmente, el tercer factor es la presencia de una presión de selección natural, que favorezca la proliferación de aquellos individuos que han cambiado, y que la definen condiciones externas, en particular la presencia de plantas de café con genes de resistencia diferentes a SH5. Si en los lotes se tienen únicamente plantas con un gen de resistencia, rápidamente puede seleccionarse una nueva raza de roya capaz de atacarlas. Por el contrario, si se tienen combinaciones de varios genes de resistencia en las variedades cultivadas, será muy difícil la proliferación de razas nuevas, pues se requerirían muchos cambios en el hongo para evadir los mecanismos de resistencia del hospedero. Razas con numerosos cambios en sus genes de avirulencia se conocen como razas complejas. Los estudios de evolución e identificación de nuevas razas de patógenos de plantas tienen gran importancia, ya que no se debe descartar la aparición de razas hipervirulentas que pueden ser devastadoras para un cultivo, de acuerdo a Avelino J. et-al 2015, cuando cita el caso del surgimiento de la raza ug99 de la roya negra del trigo (*Puccinia graminis*), la cual ha tenido efectos dramáticos en la reducción de la producción del cultivo en África, ilustra la precaución necesaria en la vigilancia del desarrollo de razas de los microorganismos fitopatógenos; la raza II ha sido históricamente la raza de la roya prevalente en la mayoría de países y ataca todas las variedades cultivadas de la especie *C. arabica* que no han sido mejoradas genéticamente por resistencia al patógeno. La evolución de la aparición de razas del patógeno ha tenido un progreso muy similar en la mayoría de países productores de café en el mundo, debido a que en todos los casos se identificó la presencia inicial de la raza II, con el posterior desarrollo de otras razas genéticamente diferentes, a partir de este inóculo inicial. Las razas del patógeno han sido estudiadas en el Centro de Investigaciones de la Roya del Cafeto (CIFC), en Portugal, en colaboración con varios países productores, estudios que han demostrado la presencia de más de 30 razas del patógeno, identificadas a partir de una serie de más de 40 diferenciales de café.

Desde 1930, Mayne, postuló la existencia de interacciones entre razas del patógeno *H. vastratix* y variedades del hospedante como la más probable explicación al fenómeno. En sus trabajos detectó cuatro razas que interactuaban con las variedades de *C. arabica*

Coorg, Kent, S.288 y S.353, éstas dos últimas procedentes de los cruces entre *C. liberica* y *C. arabica*.

Según Alvarado et-al 2005 la formación de nuevas razas es un fenómeno natural e irreversible de los hongos fitopatógenos como *H. vastatrix* para sobrevivir, ya que poseen una gama de mecanismos de variabilidad que les permiten producir individuos genéticamente diferentes cuya descendencia origina nuevas razas, además Hiroshi S.G. et-al 2007 informó que las razas VIII (V2, 3, 5), XI (v1, 2, 3, 5) y XIV (v2, 3, 4, 5), que lleva el factor v3 de virulencia, se encontraron en la India, donde variedades con el gen SH3 han sido ampliamente plantadas, por otro lado en Brasil, se encuentran raramente razas con el gen SH3, además se observaron razas VII (v3, 5) y XVI (v1, 2, 3, 4, 5) en este país, donde se encontraron en muestras procedentes de Campinas, São Paulo, y la segunda raza en muestras de Ponte Nova, en el estado de Minas Gerais, ambos con baja agresividad. Probablemente, en el Instituto Agronómico de Paraná, no existían razas de roya con el gen v3, por lo tanto, incluso en la variedad 33/1 con sólo los genes SH3 y SH5 no se observó esporulación; en Brasil, la raza más común es la raza II llevando virulencia gen v5 (Ver figura 8 y 21).



**Figura 21. Evolución de la roya sobre líneas mejoradas en el mundo: la experiencia de India y Brasil.**  
**Fuente:** Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando, 2011. Introducción del gen SH3 como estrategia para la búsqueda de resistencia durable contra la roya del café

La identificación de roya en ciertos materiales diferenciales desarrollados en el CIFC confirma la presencia de la raza XXIX en Colombia o una raza con un genotipo muy similar. El análisis de agrupamiento de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 de *H. vastatrix* aislados de materiales de las variedades Caturra y Colombia, reveló la diversidad genética de las razas de roya en Colombia. La secuencia encontrada con mayor frecuencia en la población estudiada está distante de las secuencias de las razas II y XXII, por tanto se presume que el tiempo que han permanecido estas razas en el país ha permitido su diversidad en nuevas razas. Los resultados confirman que *H. vastatrix* es un hongo con una alta tasa de mutación, con una alta probabilidad de adaptación para superar los genes de resistencia de su hospedero. La evolución de la aparición de razas del patógeno ha tenido un progreso muy similar en la mayoría de países productores de café en el mundo, debido a que en todos los casos se identificó la presencia inicial de la raza II, con el posterior desarrollo de otras razas diferentes genéticamente, a partir de este inóculo inicial. Las razas del patógeno han sido estudiadas en el CIFC (Centro de Investigaciones de las Royas del Café), en Portugal, en colaboración con varios países productores, y estos estudios han demostrado la presencia de más de 30 razas del patógeno, identificadas a partir de una serie de más de 40 diferenciales de café. La raza II ha sido históricamente la raza prevalente en la mayoría de países y ataca todas las variedades cultivadas de la especie *C. arabica* que no han sido mejoradas genéticamente por resistencia al patógeno. Las plantas diferenciales para la roya en café son un grupo de plantas, aproximadamente 40, que han sido desarrolladas en el CIFC, para la identificación de razas del patógeno. Estas plantas están compuestas por variedades de café de diferentes especies, que poseen entre uno y cinco genes de resistencia al patógeno, y de acuerdo a este número de genes se clasifican en grupos fisiológicos. (Cristancho, M. A., et-al. 2012).

De acuerdo con Romero et-al 2008, en el país, varios años después de la liberación de la variedad Colombia, se empezaron a detectar incrementos en la frecuencia de plantas susceptibles en cafetales comerciales, localizados en los departamentos pioneros en su adopción, Caldas, Quindío, Risaralda y Antioquia. Para corroborar si se trataba de

nuevas razas, se realizaron muestreos en los años 1990, 1994, 1996, 1999 a 2001 y 2005, en áreas donde se combinan las mejores condiciones para el desarrollo de la enfermedad, que presentan la mayor área sembrada y donde por mayor tiempo ha estado el hongo en contacto con la variedad Colombia. Los resultados de las pruebas de inoculación con la raza II de genotipo v5, sobre hojas de las plantas que en el campo presentaban roya, mostraron que se trataba de nuevas razas diferentes de la raza II de *Hemileia vastatrix*, patogénicas a los derivados de Caturra x Híbrido de Timor (C x HdeT). En previsión al probable efecto por la aparición, cada vez más frecuente, de razas de roya sobre plantas de variedad Colombia, en 1988 en Cenicafé, se inició la búsqueda de resistencia incompleta a la enfermedad, en la progenie de aquellas plantas que experimentaban el fenómeno de quiebra de la resistencia completa y que presentaban síntomas de la enfermedad con lesiones esporuladas, pero con bajos niveles de infección. En experimentos de campo se evaluó la progenie de plantas antes resistentes, y se observaron diferencias en el progreso de la enfermedad sobre genotipos susceptibles y resistentes, en sentido incompleto (postinfectivo). Su comportamiento en el campo, ha permitido postular la hipótesis acerca de la existencia de resistencia incompleta, probablemente de naturaleza cuantitativa, en la progenie de plantas de C x H de T, una vez en ellas ocurre la pérdida de la resistencia completa. Aspectos como el proceso de adaptación del hongo, la presión de selección por virulencia y la extrema uniformidad genética del material vegetal, permiten postular que se favorece la quiebra de la resistencia específica, debido a la generación de nuevas razas del patógeno. Por lo tanto, se sugiere que en café, por ser un cultivo perenne, es más adecuado el uso de resistencia horizontal a la roya, Romero et-al 2008, plantea que la resistencia horizontal, también denominada inespecífica, incompleta o parcial, es efectiva contra todas las razas del patógeno y es controlada por sistemas de poligenes, con efecto mínimo de expresión por cada gen y alto efecto ambiental, afirma además que la resistencia durable permanece efectiva en un largo período, en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, además indica que la resistencia incompleta permite alguna reproducción del patógeno sobre el huésped y que en la mayoría de casos cuando se presenta resistencia durable a hongos y bacterias es de naturaleza cuantitativa, basada en efectos aditivos de diversos genes. Para explicar la expresión de esta resistencia

remanente, que se hace visible cuando los genes mayores son vencidos, es razonable postular la hipótesis de la naturaleza inespecífica de este tipo de resistencia horizontal en el sentido Romero et-al 2008; ha sugerido que una vez los genes de resistencia específica son vencidos por razas patogénicas complementarias, permanece un remanente de resistencia incompleta, atribuido a los mismos genes; el estudio de la herencia de características complejas implica la utilización de métodos cuantitativos como el método de medias y varianzas generacionales. El modelo propuesto por Mather y Jinks es el de uso más frecuente en las investigaciones reportadas a saber, algunas plantas F1, F2, F5 y F6 de Caturra x Híbrido de Timor de la introducción CIFIC # 1343, que se han propagado clonalmente y que se conservan en el Banco de Germoplasma de Cenicafé, y que hacen parte del programa de selección de componentes para conformar variedades compuestas con resistencia a *H. vastatrix*. El registro se hizo sobre todas las plantas de los recursos genético señalados, de los cuales existen entre 3 y 5 plantas de propagación clonal de cada uno de estos genotipos. Su ubicación en el banco de germoplasma no obedece a la estructura de ningún diseño experimental en particular. (Romero et-al 2008).

#### **4.8.3. Evolución de la roya en lotes comerciales.**

Según Alvarado 2005, la pérdida de la resistencia a la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk, en materiales antes libres de la enfermedad se observó inicialmente en plantaciones de café en Java y en la India, a finales del siglo XIX y principios del XX, además hace referencia a lo ocurrido en Java en plantaciones de *Coffea liberica*, especie que fue introducida en 1875 a ese país y que en 1895 fue severamente atacada por la roya del cafeto. En la India, la variedad de *Coffea arabica*, fue reemplazada por la variedad Coorg desde 1870, y ésta a su vez por la variedad Kent en 1918, que también mostró susceptibilidad a la roya en 1932. Desde 1930, Mayne, postuló la existencia de interacciones entre razas del patógeno y variedades del hospedante como la más probable explicación al fenómeno. En sus trabajos detectó cuatro razas que interactuaban con las variedades de *C. arabica* Coorg, Kent, S.288 y S.353, éstas dos últimas procedentes de los cruces entre *C. liberica* y *C. arabica*.

El Centro de Investigaciones de las Royas del Cafeto (CIFC) de Portugal, desde 1955 y en forma continua ha realizado estudios de la especialización fisiológica de *H. vastatrix*, a partir de los cuales se han establecido 40 grupos fisiológicos de café según su reacción a la roya; de éstos, solamente 18 son considerados como plantas diferenciales de los grupos fisiológicos. Así mismo, se han identificado 19 razas de *H. vastatrix* con capacidad para atacar derivados del Híbrido de Timor (H.T.) y al mismo tiempo a *C. arabica*, porque también poseen los genes v2, v4, v5 en diferentes combinaciones.

Los estudios de herencia de la resistencia realizados por los investigadores del CIFC, han demostrado la interacción que existe entre *Coffea* spp - *H. vastatrix* donde se aplica el complejo que entre estos ocurre y es la interacción de los genes de resistencia en el hospedante con los genes responsables de la virulencia del patógeno. De esta forma se demostró la existencia de cuatro genes de resistencia en *C. arabica*, identificados como SH1, SH2, SH4 y SH5, presentes en especies de café semisilvestres de Etiopía y en variedades comerciales. En la India se ha detectado el gen SH3 en derivados del cruzamiento entre *C. arabica* x *C. liberica*, y el SH6, proveniente del Híbrido de Timor, población en la cual se sugiere la existencia de tres genes adicionales denominados SH7, SH8, y SH9, para explicar las interacciones entre plantas diferenciales derivadas del cruzamiento entre variedades comerciales de *C. arabica* con el Híbrido de Timor, responsables de los grupos fisiológicos 1, 2, 3, R y A, y algunas razas fisiológicas con virulencia específica (Varzea et-al 2004).

Desde que la roya del cafeto fue detectada por primera vez en Colombia en la zona central cafetera, en septiembre de 1983. Previos muestreos de urediniosporas del hongo recolectadas en plantas de variedad Caturra afectadas por la enfermedad, pudo establecerse que se trataba de la raza II de genotipo v5. A partir de 1985, ya se había registrado la presencia de la roya en 22 clones de café, la mayoría de ellos afectados posteriormente durante el período 1986 a 1987 y 1990, y que pertenecen a los grupos fisiológicos W (1, 4, 5), Y (2, 4, 5) y O (1, 2, 4, 5). De estas observaciones se hace evidente la existencia de razas capaces de vencer los genes SH1, SH2, SH4, y SH5

solos o en combinación hasta de cuatro genes. También se comprobó la existencia del genotipo de virulencia v2, v5, v6 (Mayne et-al 1935). En 1995, se detectó la presencia del hongo en plantas del grupo fisiológico de resistencia R (SH6), que al ser inoculado sobre plantas de los grupos E (SH5) y R (SH6) confirmó que en ese aislamiento estaban presentes al menos los genes v5 y v6. La inoculación sobre diferenciales de los grupos 1, 2, 3, A, R y E, ratificó que se trataba de la raza XXII de genotipo v5, v6. En contraste con las razas patogénicas capaces de vencer los genes SH1, SH2 y SH4, solos o combinación que se generan rápidamente a partir de focos iniciales de la raza II, los aislamientos patogénicos a genotipos derivados del Híbrido de Timor obtenidos por cruzamiento con variedades susceptibles, parecen ocurrir con lentitud (Castillo et-al 1992); adicionalmente, su correcta identificación se dificulta notoriamente por la carencia de las respectivas plantas diferenciales para dichos genes o combinaciones de los mismos (Rodríguez et-al., 1975).

De acuerdo a Avelino J. et-al 2015, la estrategia de incluir por introgresión la resistencia del gen SH3 de la especie *C. libérica* es especialmente útil contra patógenos asexuales. Y es de resaltar que la evolución de la virulencia por recombinación del organismo patógeno se niega a dichos cambios. *H. vastatrix* se creía que era asexual hasta un reciente informe oculto de la reproducción sexual llamado Cryptosexuality (Carvalho et al. 2011). Esto indica que las uredosporas de la roya del café son capaces de realizar el proceso de la meiosis, lo que confirma una primera observación desapercibida por Rajendren (1967).

Donde la participación de los centros de investigación, los gobiernos nacionales y los organismos de financiación de varios países es crucial para la fundación de una iniciativa de este tipo

## **5. ASPECTOS METODOLOGICOS**

El proyecto de grado se realizó bajo la modalidad de monografía en la cual se obtuvo material bibliográfico cuyo aporte es relevante por sus resultados en investigación para reconocer los genes relacionados con resistencia a la enfermedad roya del cafeto. Se espera que esta información sea útil para ser usada como fuente en futuros programas de mejoramiento genético de la variedad caturra.

La información fue recolectada gran parte de libros, revistas, avances técnicos, y artículos científicos de las Bibliotecas de Cenicafé, UNAD, Universidad Nacional, Universidad de Antioquia, Universidad de Santa Rosa de Cabal, Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT e internet, igualmente se fueron realizadas entrevistas con profesionales expertos en el tema como material de apoyo para documentar y/o soportar la revisión de literatura.

Durante el año 2014 en el primer semestre se realizó una revisión bibliográfica donde se recolectó la información para construir una perspectiva teórica. A partir del mes de abril se organizó la información para realizar un análisis en interpretación de resultados durante los meses de julio a septiembre, se escribió el informe parcial y final.

Para la compilación del material y citas bibliográficas fue utilizado el programa Mendeley.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

A través de la compilación bibliográfica realizada en el presente documento se encontró que la distribución de la roya es muy amplia, además dispersa presentándose a través de 4 continentes donde se produce el cultivo del café a gran escala. Por ser un parasito biotrófico no es posible cultivarlo *in-vitro* lo que obliga al mantenimiento de aislamientos puros mediante ciclos continuos de inoculaciones en plantas susceptibles= *Coffea arabica*, y *Coffea canephora*.

*C. arabica* por ejemplo es un híbrido formado por dos especies diploides *C. eugenioides* y *C. canephora*, esta especie posee una diversidad genética muy baja, razón por la cual es susceptible a la mayoría de las enfermedades, la ventaja del genero *Coffea* es la posibilidad de obtener híbridos interespecificos, entre la mayoría de géneros que lo conforman, producto de un origen monofilético (Romero et-al 2010). Aunque dicha característica, es una desventaja en cuanto a la susceptibilidad a enfermedades, es una ventaja a la hora de establecer programas de mejoramiento genético del café, ya que facilita la introducción de genes de una especie a otra (hibridación interespecifica entre las especies *C. arabica* y *C. canephora*) dando como resultado un número importante de líneas, con excelentes características agronómicas y elevada resistencia a la roya, condición que ha sido aplicada por el programa de mejoramiento de por Cenicafé (Romero et-al., 2010 citado por Alzate 2014).

En general cada planta tiene cierto nivel de resistencia no específica a enfermedades, que se denomina resistencia horizontal y que es generado por un grupo de genes también llamado resistencia poligénica, este tipo de resistencia no evita que las plantas sean infectadas, sino que retarda el desarrollo de cada uno de los lugares de infección en la planta y por lo tanto retrasa la propagación de la enfermedad y el desarrollo de las epifitas en el campo, para el caso del café algunos autores como Alvarado A. G;Burdon, J. J; Cristancho, M. A., Roza; Escobar C., Rivillas; Guerreiro F.O; Gonzales M.L.F; Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando; Hiroshi S.G, entre otros, citan los

genes SH 1 a 9 como resistentes a la enfermedad, pero su capacidad se ve reflejada a la combinación de estos genes.

Los genotipos de los cafés con genes SH1 y SH4 presentan menos resistencia a la enfermedad en el campo si estos genes son expuestos a las razas de roya con los genes v1 y v4, respectivamente; además el gen SH2 no le confiere resistencia elevada a la enfermedad, por lo tanto, cuando los cafés con este gen se inocularon con razas que llevan el gen de virulencia v2, se produce una alta susceptibilidad. (Hiroshi S.G. et-al 2007, citado por Alzate 2014).

Vanderplank (1984), citado por Alzate (2014), mencionó la pérdida de la resistencia en materiales que anteriormente habían estado libres de la enfermedad, lo cual se observó por primera vez en cafetales de Java e India, a finales del siglo XIX y principios del XX. Esto destaca la alta virulencia que puede tener la roya.

Desde 1930, en estudios desarrollados en café como: Evolución de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en Colombia; Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de caturra x híbrido de timor; Outbreak of coffee leaf rust *Hemileia vastatrix* in Colombia. In: New Disease Reports; Evolución de razas de *H. vastatrix* en Colombia, Identificación de la Raza II de *Hemileia vastatrix* Berk y Br. en Colombia; La Roya del Cafeto en Colombia (Impacto, manejos y costos del control, resultados de investigación, y Genoma del café: Solución o utopía., se encontró la existencia de interacciones entre razas del patógeno y variedades del huésped. Según Vanderplank el principal mecanismo para la aparición de las razas es la mutación, que puede ocurrir por fenómenos como la exposición a la luz ultravioleta, la alta cantidad de urediniosporas que produce el hongo y la presencia de una presión de selección natural, que favorezca la proliferación de aquellos individuos que han cambiado, y que la definen condiciones externas. La presencia de genes resistentes a la enfermedad, en el género *Coffea*, pudo irse quebrantando por los mecanismos anteriormente mencionados, factor que pudo utilizar el patógeno para aumentar su poder de capacidad de colonización.

En Colombia, la evolución de la aparición de razas del patógeno ha tenido un progreso muy similar al de la mayoría de países productores de café en el mundo, debido a que en todos los casos se identificó la presencia inicial de la raza II, con el posterior desarrollo de otras razas genéticamente diferentes a partir de este inóculo inicial; según Leguizamón C et-al 1984, esta es la raza más sencilla y tiene mayor dispersión en todo el mundo, además carece del gen de avirulencia 5. Esta solo puede atacar a plantas de café que aunque tengan el gen de resistencia SH5, carecen de todos los demás genes de resistencia. En este grupo se encuentran la mayoría de las variedades tradicionales cultivadas de la especie *Coffea arabica*, incluyendo Caturra, Típica, Mokka, Geisha, Pacamara y Maragogipe. Debido a procesos evolutivos, la raza II puede perder otros genes de avirulencia, generar una nueva raza y ampliar así su rango de acción sobre diversos genotipos de café, es de resaltar que caturra era la variedad de preferencia del caficultor Colombiano, debido al tamaño del grano, calidad en la taza y la consistencia, factores por los que el agricultor estuvo dispuesto a correr el riesgo de la incidencia de la enfermedad en ese momento, ya que no estaba muy cómodo utilizando variedades como Colombia, por el tamaño del grano; actualmente el caficultor Colombiano se encuentra en proceso de migrar a Castilla, variedad de la cual obtiene las características anteriormente mencionadas, con la ventaja de presentar resistencia a Roya.

Se encontró que Hiroshi S.G. et-al., 2007 realizaron investigaciones en variedades susceptibles a *H. vastratix* con las razas de roya IAPAR (Instituto Agronómico de Paraná) con los genes de avirulencia v1, v2, v4, v5 y v8 solos o en combinaciones, en las cuales se determinó que el gen SH2 no le confiere resistencia a la enfermedad, por lo tanto, cuando los cafés con este gen se inocula con razas que llevan el gen de virulencia V2, se produce una alta susceptibilidad, además las razas fisiológicas de la roya de la hoja han ido quebrantando la resistencia de algunos de los genes de resistencia SH especialmente (SH1 y SH4), presentando menos resistencia a la enfermedad en el campo, si estos genes son expuestos a las razas con los genes v1 y v4, respectivamente; en dichas investigaciones se evaluaron diferentes cultivares (Ver figura 8) H420/10 (SH5, 6, 7, 9) y H419/20 (SH5, 6, 9) mostró resistencia en la evaluación realizada en IAPAR, mientras que el mismo H420/2 (SH5, 8) presenta susceptibilidad, sin embargo, estos tres diferenciales presentan susceptibilidad a algunas razas existentes en el mundo. Esto

podría indicar la ausencia de razas fisiológicas tales como XXIX (v5, 6, 7, 8, 9), XXXI (v2, 5, 6, 9), XXXVII (v2, 5, 6, 7, 9) y XXXIX (v2, 4, 5, 6, 7, 8, 9), y donde materiales que se consideraban resistentes, pero que actualmente presentan susceptibilidad, razón por la cual se considera que se ha roto la resistencia, esto de acuerdo a Gonzales et-al 2009 se podría considerar como un proceso de mutación del patógeno, donde se ha hecho un gran esfuerzo para obtener variedades con resistencia durable contra la roya, pero la continua aparición de nuevas razas del hongo, ha hecho difícil esta tarea para los mejoradores.

Para un cultivo perenne como el café, donde un cultivar necesita rendimiento y vida útil de al menos 15 años, de acuerdo a Gonzales M.L.F. 2009, citado por Alzate, 2014, la resistencia duradera a la roya es muy importante para ser un cultivo exitoso, ya que la roya causa una reducción en el rendimiento entre 20% y 30%, y cuyos costos de control van en el orden del 10% y 20% de los costos de producción. En Colombia por ejemplo la última epidemia severa de roya, ocurrió en los años 2008 y 2009; en la variedad caturra, y se ha estimado que esta enfermedad causó pérdidas de hasta un 23% de la producción acumulada en 4 cosechas.

El gen SH3 y ciertos genes de *C. canephora* provenientes del "**Híbrido de Timor**" = *C. arabica* (Típica) x *canephora* (Robusta) e "Icatu" pueden otorgar una resistencia duradera, sobre todo cuando es utilizado en combinaciones como por ejemplo:

**Tabla 2: Presencia de genes SH en algunas variedades de café.** Modificado de Figura 8, Fuente: Hiroshi S.G. et-al 2007. Resistance to Leaf Rust in Coffee Carrying SH3 Gene and others SH Genes. Vol. 50: pp 753-757.

Variedad	Genes
33/1-S288-23	SH3-SH5
H153/2	SH1-SH3-SH5
H151/1	SH3-SH4-SH5

<b>H419/20</b>	<b>SH5-SH6-SH9</b>
H420/10	SH5-SH6-SH7-SH9;
Híbrido de Timor 1-2	SH5-SH6-SH7-SH8-SH9

Como se observa en la tabla 2 se encuentra que la variedad H419/20, no tiene presente el gen SH3, y presenta resistencia a la enfermedad, por lo tanto corroboramos lo citado por Gonzales et-al 2009, donde menciona: Los genes de resistencia presentes en *C. arabica*, donde sobresalen variedades como Caturra, Catuai, Borbon, Mundo Novo, Tipica, Villa Sachi y Maragogipe, encontrándose los genes= SH1-SH2-SH4-SH5, usados solos o en combinación, no garantizan una resistencia durable contra la enfermedad; sin embargo, cuando estos genes son usados en combinación con aquellos derivados de las especies diploides, *C. canephora* donde se encuentran los genes SH6-SH7-SH8-SH9, y *C. liberica* variedad de la cual proviene el factor SH3 el resultado es una resistencia más durable y efectiva.

La resistencia según Cristancho et-al., 2012 puede verse afectada debido a que el patógeno *H. vastatrix* tiene una dependencia total de la planta de café, porque este género es su único hospedero conocido, y sólo puede alimentarse de células vivas de la hoja para crecer y reproducirse, la capacidad de realizar este parasitismo depende de una compleja interacción entre estos dos organismos, de manera que para que una infección sea exitosa y culmine en enfermedad, el hongo debe desactivar señales químicas propias y así pasar desapercibido a los mecanismos de resistencia que tenga la planta.

Para el caso de la roya del cafeto, hasta el momento se reconocen al menos nueve señales del patógeno, denominadas genes de avirulencia, que son detectadas por otros nueve mecanismos en el hospedero, conocidos como genes de resistencia, a cada gen de resistencia se le confiere una raza fisiológica pudiéndose presentar solo o en combinaciones, debido a procesos evolutivos las razas pueden perder genes de

avirulencia, generar una nueva raza y ampliar su rango de acción sobre diversos genotipos de café.

Según Gonzales et-al 2009 citado por Alzate 2014, se considera que la acumulación de genes de resistencia en un solo genotipo (método conocido como piramidización) o el uso de líneas con diferentes combinaciones de estos genes en variedades compuestas, son la mejor opción para lograr una resistencia verdaderamente durable contra la roya del cafeto, en este sentido, si se tienen combinaciones de varios genes de resistencia en las variedades cultivadas, será muy difícil la proliferación de razas nuevas, pues se requerirían muchos cambios en el hongo para evadir los mecanismos de resistencia del hospedero, en este sentido lo que este método busca es obstruir el quiebre de la resistencia de la variedad a la enfermedad, por tanto dicha resistencia se vuelve más duradera.

En la revisión de literatura se encontró que en roya existen diversas razas con numerosos cambios en sus genes de avirulencia las cuales se conocen como razas complejas o razas hipervirulentas que pueden ser devastadoras para un cultivo, siendo el caso por ejemplo del surgimiento de la raza ug99 de la roya negra del trigo. En café según Cristancho et-al 2012 el hongo presenta varios genes de avirulencia (V) que delatan su presencia si son detectados por los correspondientes genes de resistencia (R) presentes en café (**R4,R5,R6,R1**-V4,V5V6V7), En el caso de la variedad Caturra (**R5**-V4,V6,V7), sólo posee el gen de resistencia 5, que no puede detectar al correspondiente gen de avirulencia 5 de la raza II, pues ésta no lo tiene, dando como resultado la aparición de la enfermedad y en el caso de las variedades Colombia y Castillo (**R4,R5,R6,R1**-V4.V6.V7) existen varios genes de resistencia que pueden detectar la presencia del patógeno y generan una reacción de resistencia. Según Alvarado et-al 2005, la roya del cafeto fue detectada por primera vez en Colombia en la zona central cafetera, en septiembre de 1983. Previos muestreos de urediniosporas del hongo recolectadas en plantas de variedad Caturra afectadas por la enfermedad, pudo establecerse que se trataba de la raza II de genotipo v5. A partir de 1985, ya se había registrado la presencia de la roya en 22 clones de café, la mayoría de ellos afectados posteriormente durante el período 1986 a 1987 y 1990, y que pertenecen a los grupos fisiológicos W,Y y O. De estas

observaciones se hace evidente la existencia de razas capaces de vencer los genes SH1, SH2, SH4, y SH5 solos o en combinación hasta de cuatro genes. También se comprobó la existencia del genotipo de virulencia v2, v5, v6. En 1995, se detectó la presencia del hongo en plantas del grupo fisiológico de resistencia R (SH6), que al ser inoculado sobre plantas de los grupos E (SH5) y R (SH6) confirmó que en ese aislamiento estaban presentes al menos los genes v5 y v6. La inoculación sobre diferenciales de los grupos 1, 2, 3, A, R y E, ratificó que se trataba de la raza XXII de genotipo v5, v6. En contraste con las razas patogénicas capaces de vencer los genes SH1, SH2 y SH4, solos o combinación que se generan rápidamente a partir de focos iniciales de la raza II, los aislamientos patogénicos a genotipos derivados del Híbrido de Timor obtenidos por cruzamiento con variedades susceptibles, parecen ocurrir con lentitud. La quiebra de la resistencia de genotipos antes poseedores de resistencia completa a la enfermedad, y la aparición cada vez más frecuente de roya en materiales experimentales de ese origen y sobre plantaciones comerciales sembrados con la variedad Colombia, refuerzan la hipótesis sobre la complejidad de la virulencia de las razas de *H. vastatrix* existentes en Colombia.

Para hacer frente a la roya, en Colombia, Cenicafé desarrolló una variedad compuesta: La variedad Colombia, quien ha permitido mantener una elevada resistencia contra la roya por más de 25 años. Las investigaciones de Cenicafé comenzaron antes de que la enfermedad llegara al país en septiembre de 1983. Todo comenzó en 1968 con el cruce de la variedad Caturra y el Híbrido de Timor, resistente a la roya, y con una selección de perfiles durante 5 generaciones para asegurar que la nueva variedad de porte bajo no sólo fuera resistente contra la roya, sino también que tuviera altos estándares de calidad y rendimiento. Lanzada por primera vez en 1982, la variedad conocida como variedad Colombia fue muy productiva, y a lo largo de las décadas se sometió a sucesivas mejoras. A diferencia de las variedades mono-línea como las conocidas como Catimor, la variedad Colombia es una variedad compuesta, es decir, el resultado de semillas de muchas progenies de generación F5; posteriormente, se han desarrollado otras variedades compuestas, sin embargo la que más ha sobresalido entre los caficultores es la variedad Colombia. El lanzamiento de variedades compuestas (variedades con una

mezcla de semillas que consta de varios padres con diferentes fuentes de resistencia) se hizo para alcanzar resistencias más duraderas, teniendo en cuenta que el café es un cultivo semi-permanente (Mayor a 5 años) y que en las regiones cafeteras colombianas el cultivo de café es con frecuencia continuo, posterior a esto la federación Nacional de Cafeteros opto por lanzar la variedad Castillo y sus derivados regionales siendo la respuesta, desde el punto de vista de desarrollo genético, a más de 500 mil caficultores que se enfrenta a los desafíos de la roya y CBD. Esta variedad fue obtenida a partir de un cruce entre las variedades **Caturra e Híbrido de Timor**, donde se utilizó el método de selección en línea en las generaciones separadas y subsecuentes de la progenie (F3, F4, F5). Castillo busca el resultado de una resistencia perdurable a la roya y de una mayor productividad, además de una resistencia probada y preventiva contra la nueva amenaza del CBD (Coffee Berry Disease= Enfermedad del fruto del café). También tiene rasgos distintivos de calidad, tales como mayor tamaño y densidad del grano. Su composición genética es muy similar a la del Caturra, teniendo en cuenta las notas particulares y el perfil de taza que los expertos han llegado a esperar de diferentes regiones cafeteras de Colombia. Tanto esta variedad como las variedades liberadas posteriormente (Tabi y Variedad Castillo), poseen un fondo genético derivado del híbrido de Timor.

En el país el monitoreo y ajuste constante de la resistencia que poseen las líneas que componen estas variedades ha permitido mantener una resistencia elevada contra la enfermedad, la aparición cada vez más frecuente de razas compatibles con los derivados de este híbrido, hace necesario pensar en incorporar otras fuentes de resistencia en este caso la heredabilidad de la resistencia horizontal donde está bajo el control de muchos genes, además de la adición de un nuevo gen como el SH3, derivado de *C. liberica*, y que confiere resistencia a *H vastratix*, Esta variedad crece hasta 10 a 15 m de altura, además de soportar la exposición al sol mejor que la mayoría de los otros miembros del género y tiene una buena retención de sus frutos maduros, pero que también produce granos de baja calidad y tiene una proporción promedio de fruta fresca en relación con los granos secos de más o menos 10 a 1, por lo que debe ser tenido en cuenta en programas de mejoramiento genético ligado a la calidad en la taza del café y al porte de la planta; esta característica es sin duda una alternativa promisoría.



Según Ribas et-al., 2011, citado por Alzate 2014 el gen de resistencia (factor de resistencia  $S_H3$ ) ha sido insertado con éxito de *C. liberica* en cultivares agronómicamente importantes de Arábica. En los últimos años, los mapas genéticos y físicos del locus  $S_H3$  fueron terminados. Además, el uso de la fluorescencia *in situ* hibridación en *C. arábica*, en el locus  $S_H3$  se encuentra en una posición distal en un cromosoma que pertenece al grupo homeologous, esta técnica de la citogenética de fluorescencia *in situ* en marca los cromosomas en puntos de interés mediante la cual los mismos son hibridados con sondas que emiten fluorescencia permitiendo la visualización de la región de cromosomas estudiada; esta técnica nos permite verificar duplicaciones, inversiones, microdeleciones, et-al. Por otra parte el grupo de cromosomas homeologus son el conjunto de un cromosoma materno y paterno que se emparejan en la meiosis y esta copia genera los mismos genes el mismo lugar o loci, en este sentido podemos afirmar que la introgresión progresiva de diferentes genes de resistencia en una sola variedad usando métodos convencionales de mejoramiento, puede ser una estrategia difícil debido a la presencia de genes ya existentes, que tienden a enmascarar los genes introducidos (fenómeno conocido como epistasis), haciendo más difícil la selección.

Se encontró que Alvarez G.M. 2011, Egea-Gilabert et al., 2003; Noir et al., 2001; Romero et al., 2010; Soriano et al., 2005; Yu M et al., 1996), citado por Alzate, 2014 determinan que la selección asistida por marcadores (MAS, por sus siglas en inglés (“Marker-Assisted Selection”), es un método que facilita la selección precoz de los genotipos, acelerando el proceso de selección mientras asegura la presencia de los genes deseados, siendo superior en ventajas respecto a la mejora convencional de plantas, el cual se basa en la selección por el fenotipo de los individuos de interés por alguna característica distintiva en este caso resistencia a *H. vastratix*, entre los individuos de progenies segregantes resultado de la hibridación, que puede aplicar a café de acuerdo a Guglielmo C. Z. 2009, en su publicación: Ingeniería genética aplicada al café. La obtención de nuevos cultivares por esta vía se toma no menos de 8 a 10 años comparados con los programas de mejoramiento actuales de café 25 años como mínimo y teniendo en cuenta que en ocasiones, no se garantiza la obtención de ese cultivar mejorado. El MAS o Selección Asistida por Marcadores por otra parte es la selección indirecta de un rasgo de interés, donde propiamente no es basado en dicha característica

sino en un marcador ligado ella, por ejemplo si MAS es usado para seleccionar algunos individuos resistentes a *H. vastratix* se busca un marcador alelo que esté vinculado con la resistencia a la enfermedad (Sat244 y BA-124-12K-f), y este marcador es utilizado para la selección de esta asociación que presenta una alta frecuencia con el gen o locus de características de interés, debido al ligamiento genético (Proximidad en el cromosoma entre el locus marcador y el de la enfermedad de resistencia), para esta selección son utilizadas dos técnicas SCAR= Sequence Characterized Amplified Region (Dominantes) y CAPS= Cleavage Amplified Polymorphic Sequence (Codominantes+ Enzima de restricción que digiere el producto de restricción). MAS es útil para seleccionar los rasgos que son difíciles de medir, que exhiben baja heredabilidad y su expresión es de tardío desarrollo, por medio de validación de marcadores estos marcadores se establece que de los 10 marcadores evaluados en café solo 2 (Sat244 y BA-124-12K-f) permitirían determinar en forma clara y repetible la presencia del gen SH3. Adicionalmente Sat244 distingue posibles variaciones alélicas de este gen, tanto en la especie *C. liberica* como en materiales arábigos introgresados en ella, pero el alto costo de la MAS continua siendo un gran obstáculo para la adopción de esta en los programas de mejoramiento, especialmente en países en vía de desarrollo, (Alvarez, 2011, citado por Alzate 2014), esto de acuerdo a Guglielmo C. Z. 2009= Ingeniería genética aplicada al café, citado por Alzate 2014, se podría considerar como una oportunidad de mejora, de acuerdo al éxito reportado en relación a la introducción de genes foráneos (reporteros y/o de selección) en café, utilizando diferentes métodos de transformación, biológicos (*Agrobacterium*) y métodos físicos (polietilenglicol, electroporación y biobalística) con la finalidad de introducir genes (SH3) para la resistencia a enfermedades en el género *Coffea*, extraídos de *C. liberica*.

El empleo de los marcadores moleculares facilitan el trabajo de los fitomejoradores al permitir rastrear un patrón hereditario de un gen sin identificar, pero que su ubicación aproximada se conoce, este es un segmento de ADN con ubicación física identificable en el cromosoma y herencia genética rastreable, en este orden de ideas hasta la fecha se han identificado 10 marcadores moleculares estrechamente al gen SH3 de resistencia a la roya. Estos marcadores derivados de una caracterización molecular detallada de la

región genómica portadora de dicho gen, han abierto por primera vez la posibilidad de utilizar la selección asistida en el mejoramiento del café arábigo. Por esta razón se hace indispensable validar el grupo de los 10 marcadores con el fin de determinar cuáles de ellos pueden ser de utilidad para asistir la selección de genotipos portadores del gen SH3, donde se evidencia la presencia-ausencia de los marcadores moleculares ligados al gen SH3 de resistencia a roya (Mahe, {2008, citado por Alzate, 2014).

De acuerdo a Ribas et-al 2011, en su ambiente natural, las plantas se encuentran con una amplia gama de microorganismos patógenos tales como virus, bacterias, oomicetos, hongos y nematodos, para defenderse de la infección por estos patógenos, las plantas emplean una red de mecanismos entrelazados, uno de tales mecanismos de defensa se basa en la resistencia a enfermedades (R) genes que median la resistencia a los patógenos que poseen correspondientes genes de virulencia (Vr). La clase más grande de genes R conocidos incluye los que codifican proteínas NBS-LRR ricas en leucina, estas pertenecen a una de las familias más grandes y más variable de genes entre los genomas vegetales, y dentro de esta familia se encuentra el gen SH3, resistente a la roya del café introgresado con éxito en el género *C. libérica*, es de resaltar la evolución que ha sufrido este gen debido a la selección natural donde influye la evolución molecular de las secuencias mediante el aumento o la reducción de la probabilidad de fijación de una mutación dada, que respectivamente, aumenta o reduce la aptitud de los individuos que lo lleva. El efecto de la selección natural en una secuencia de genes puede ser evidenciada mediante el análisis de las sustituciones de nucleótidos que se produjeron entre dos variantes de este gen (Sustituciones de nucleótidos que no cambian la totalidad de la secuencia de aminoácidos para no modificar el fenotipo), y su acumulación se considera que es influenciado por la selección natural. En este orden de ideas la evolución de los genes resistentes son un proceso dinámico que implica principalmente la duplicación, la supresión, cambio de secuencia, punto de mutación, selección diversificada, la recombinación, la conversión génica y la inserción, en este sentido es de resaltar que la estructura del locus SH3 es bien conservada y se puede concluir que el origen de la mayoría de las copias SH3 es anterior a la divergencia entre las especies de *Coffea*, los homólogos de genes SH3 son encontrados en varias especies

dicotiledóneas incluyendo *Solanum spp*, las rutas evolutivas específicas de los genes que codifican proteínas NBS-LRR dan a conocer que el análisis de secuencias de la región SH en genomas de café, *C. canephora* y *C. arabica* revela la presencia genes R en los genomas de estas variedades, con base a este argumento según Alvarado A. G. 2005, se puede afirmar que la herencia de la resistencia donde se aplica el complejo *Coffea spp*– *H. vastatrix*. Además en este proceso ocurre interacción entre los genes de resistencia en el hospedante con los genes responsables de la virulencia del patógeno, de esta forma se demuestra la existencia de cuatro genes de resistencia en *C. arabica*, identificados como SH1, SH2, SH4 y SH5 presentes en especies de café semi-silvestres y en variedades comerciales (Caturra, Borbón, Típica, et-al). En la India se ha detectado el gen SH3 derivado del cruzamiento entre *C. arabica* x *C. liberica*, y el SH6, proveniente del Híbrido de Timor, población en la cual se sugiere la existencia de tres genes adicionales denominados SH7, SH8, y SH9, explicando las interacciones entre plantas diferenciales derivadas del cruzamiento entre variedades comerciales de *C. arabica* con el Híbrido de Timor.

Por lo tanto, se sugiere que en café, por ser un cultivo perenne, es más adecuado el uso de resistencia horizontal contra la roya bajo el control de los genes SH1 a SH9, o también denominada inespecífica, incompleta o parcial, es efectiva contra todas las razas del patógeno y es controlada por sistemas de poligenes, con efecto mínimo de expresión por cada gen y alto efecto ambiental, afirma además que esta resistencia durable permanece efectiva en un largo período, en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, además indica que la resistencia incompleta permite alguna reproducción del patógeno sobre el hésped y que en la mayoría de casos cuando se presenta resistencia durable a hongos y bacterias es de naturaleza cuantitativa, basada en efectos aditivos de diversos genes.

Se encontró que a partir de 1985, de acuerdo a Alvarado A. G. 2005, ya se habían registrado la presencia de la roya en 22 clones de café, la mayoría de ellos afectados. De estas observaciones se hacía evidente la existencia de razas capaces de vencer los genes SH1, SH2, SH4, y SH5 solos o en combinación hasta de cuatro genes, los

aislamientos patogénicos a genotipos derivados del Híbrido de Timor obtenidos por cruzamiento con variedades susceptibles, parecían ocurrir con lentitud, razón por la cual se considera que se había roto la resistencia. La experiencia adquirida con la liberación de la variedad Colombia, compuesto resistente a la roya del cafeto que ha sido sembrada continuamente desde 1982, muestra que la evolución de la roya sobre el germoplasma de ese origen es un proceso lento, además como consideración general, el aprovechamiento de la diversidad de genes de resistencia SH6, SH7, SH8, SH9, y de otros provenientes del H.T. (Híbrido de Timor), han logrado mediante la mezcla de progenies conformar las variedades compuestas con resistencia a la roya siendo un proceso exitoso al reducir que la probabilidad de razas patogénicas se establezcan y posteriormente, se propaguen con rapidez en las plantaciones comerciales. No obstante, el fenómeno de la aparición de nuevas variantes del patógeno compatibles con los derivados del H.T. es un proceso natural e irreversible, **¿Qué hacer entonces?**= De acuerdo a Herrera-Pinilla et-al 2011 debemos aumentar la variabilidad mediante la inclusión de nuevos genes y/o combinaciones de genes de resistencia en las variedades compuestas diseñando líneas mejoradas portadoras del gen **SH3** obtenidas de *C. liberica* en un menor tiempo y a un costo más bajo que el esperado siguiendo los métodos convencionales. La generación de nuevas combinaciones de genes de resistencia incluyendo el gen SH3, promete aumentar la durabilidad de la resistencia a la roya obtenido de genotipos avanzados= Líneas H.T (Híbrido de Timor) F3 y F4 x Arabicas introgresados portadores del gen SH3 (Kawisari, S.288, S.795, BA.10).

## 7. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se logró compilar gran cantidad de información relacionada para la resistencia del café en cuanto a la roya, encontrándose que el gen SH3 cumple un papel fundamental generando una resistencia mucho más durable contra *H. vastratix*, ya que se puede evidenciar que su presencia en la compañía de otros genes SH en algunas variedades generan dicha característica.
- *Hemileia vastratix* se encuentra en cada uno de los continentes donde se produce el cultivo de café a gran escala.
- La evolución de la aparición de razas del patógeno ha tenido un progreso muy similar en la mayoría de países productores de café en el mundo, debido a que en todos los casos se identificó la presencia inicial de la raza II.
- Los principales genes que intervienen en la resistencia a *H. vastatrix* son SH1-SH2-SH3-SH4-SH5-SH6-SH7-SH8-SH9, donde su eficacia se ve ligada a una resistencia horizontal de la variedad.
- Los genes SH 1 a 9 son resistentes a la enfermedad *H. vastratix*, pero su capacidad se ve reflejada a la combinación de estos.
- La resistencia del café a la roya, está condicionada por al menos a 9 factores o genes dominantes denominados (SH1 a SH9) que puede presentarse solos o en combinación. De estos factores de resistencia SH1, SH2, SH4 y SH5 han sido encontrados en *C. arabica*; los otros SH6, SH7, SH8 y SH9, han sido introgresados de la especie diploide *Coffea canephora* a través del híbrido, variedades arabica y robusta respectivamente, SH3 es obtenido de *C. liberica*.
- La resistencia es menos duradera y efectiva cuando se cruzan variedades arábicas x arábicas, las que presentan los genes SH1-SH2-SH4-SH5, donde se podría pensar en la resistencia horizontal para este caso, pero es de resaltar que aquí habría una excepción. Los programas de mejoramiento genético del país por su parte van encaminados al cruce de variedades *C. Canephora*-*C. arabica* –*C. liberica*, dando resistencia a la enfermedad y calidad en la taza del grano.

- La resistencia a *H. vastatrix* está determinada por diferentes genes, dicha resistencia es más duradera cuando se presenta el cruce de arábicos SH1-SH2-SH4-SH5 x *C. Canephora-C.liberica* SH3-SH4-SH5-SH6-SH7-SH8-SH9, se puede observar que el mejoramiento genético del país se encamina a la resistencia horizontal generando durabilidad en dicha característica.
- Todas la especies de café evaluadas que llevan el gen SH3 presentan resistencia a *H. vastratix*.
- La adición de un nuevo gen como el SH3, derivado de *C. liberica*, es sin duda una alternativa promisorio, donde se puede evidenciar que su presencia en cualquier variedad genera resistencia a la enfermedad, por lo cual se considera que las variedades que se produzcan en la lucha contra la roya deberían poseer este gen, teniendo en cuenta no reducir la calidad de en el grano.
- Por ser un cultivo perenne, es más adecuado el uso de resistencia horizontal a la roya, adicionando según las necesidades en las características de la planta la utilización de variedades arabica o robusta. .
- La ventaja del genero *Coffea* es la posibilidad de híbridos interespecíficos, entre la mayoría de géneros que lo conforman, producto de un origen monofilético, de esta manera se aprovecha la ventaja anteriormente mencionada generando un programa de hibridación interespecífica entre las especies.
- La resistencia horizontal, también denominada inespecífica, incompleta o parcial, es efectiva contra todas las razas del patógeno y es controlada por sistemas de poligenes, con efecto mínimo de expresión por cada gen y alto efecto ambiental, además la resistencia durable permanece efectiva en un largo período, en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, en estos procesos evolutivos de *H. vastratix* puede perder otros genes de avirulencia, generar una nueva raza y ampliar así su rango de acción, es allí donde la suma de los genes de resistencia o resistencia horizontal cumplen su función, haciendo el trabajo más difícil a los genes de avirulencia de la enfermedad.
- El principal mecanismo para la aparición de las razas es la mutación, que puede ocurrir por fenómenos como la exposición a la luz ultravioleta, la alta cantidad de urediniosporas que produce el hongo y la presencia de una presión de selección

natural, que favorezca la proliferación de aquellos individuos que han cambiado, y que la definen condiciones externas.

- El gen SH2 no le confiere resistencia elevada a la enfermedad, por lo tanto, cuando los cafés con este gen se inoculan con razas que llevan el gen de virulencia v2, se produce una alta susceptibilidad.
- Los genotipos de los cafés con genes SH1 y SH4 presentan menos resistencia la enfermedad en el campo cuando estos genes son expuestos a las razas con los genes v1 y v4, respectivamente.
- El gen SH3 y ciertos genes de *C. canephora* como del "**Híbrido de Timor**" = *C. arabica* (Típica) x *canephora* (Robusta) e "Icatu" es mucho más eficiente para obtener resistencia duradera, sobre todo cuando es utilizado en combinaciones con los demás genes SH.
- A nivel agronómico se conocen 2 marcadores el Sat244 y el BA-124-12K-f los que permiten determinar en forma clara y repetible la presencia del gen SH3, además, el Sat244 distingue posibles variaciones alélicas del gen, tanto en la especie *C. liberica* como en materiales arábicos introgresados por ella. La presencia de estos marcadores corresponde muy bien con la reacción de resistencia a la roya, lo que sugiere que las razas compatibles con este gen de resistencia no existen o se encuentran en muy baja frecuencia.
- Los genes de resistencia presentes en *C. arabica*, usados solos o en combinación, no garantizan una resistencia durable contra la enfermedad; sin embargo, cuando estos genes son usados en combinación con aquellos derivados de las especies diploides, *C. canephora* y *C. liberica*, el resultado es una resistencia más durable y efectiva.
- El método conocido como piramidización o el uso de líneas con diferentes combinaciones de estos genes, en variedades compuestas, parecen la mejor opción para lograr una resistencia verdaderamente durable contra la roya del cafeto debido a que si se tienen combinaciones de varios genes de resistencia en las variedades cultivadas, será muy difícil la proliferación de razas nuevas, pues se requerirían muchos cambios en el hongo para evadir los mecanismos de resistencia



del hospedero, en este sentido lo que este método busca es obstruir el quiebre de la resistencia de la variedad a la enfermedad, por tanto dicha resistencia se vuelve más duradera.

## 8. RECOMENDACIONES

- En Colombia y a nivel mundial se debe prever que en los programas de mejoramiento genético la utilización de una estrategia de selección asistida que busque la piramidización del gen SH3 sobre las líneas de apoyo (Robustas y arabicas).
- El presente trabajo constituye un apoyo para el estudio de estrategias y herramientas bibliográficas en la selección de genotipos de café en Colombia, de este modo se busca ampliar cada vez más la resistencia contra la enfermedad (*H. vastratix*), teniendo en cuenta la estrategia investigativa, y la importancia del cultivo en el país, en este orden de ideas para afrontar la enfermedad en Colombia es claro que deben ser establecidas variedades resistentes a la enfermedad como Castillo. En el caso de tener en estos momentos variedades susceptibles a la enfermedad se recomienda estar informados respecto a las condiciones climáticas, e implementar el manejo integrado de roya.
- Los programas de mejoramiento genético debe considerar lograr una variedad resistente a la enfermedad, que se puede obtener de *C. canephora* y *C. liberica* (Variedades robusta y libérica) pero que proporcionan un café con un sabor peculiar, con especies arábicas que aunque no son resistentes a dicho patógeno generen una taza suave que representa la producción nacional en Colombia.
- Se hace indispensable validar el grupo de los 10 marcadores moleculares ligados estrechamente al gen SH3 de resistencia a la roya con el fin de determinar cuáles de ellos pueden ser de utilidad para asistir la selección de genotipos portadores del gen.
- Estudiar el caso del gen SH2 que no le confiere resistencia elevada a la enfermedad, ya que cuando los cafés con este gen se inoculan con razas que llevan el gen de virulencia v2, se produce una alta susceptibilidad, esto con el objetivo de evitar que el mismo caso ocurra en variedades nuevas.

## 9. REFERENCIAS

1. Álvarez-Mendez EL, Acuña-zornosa JR, Gaitán-bustamante Á (2002) Búsqueda de secuencias homologas a genes de resistencia a insectos en el genoma de *Coffea arabica* L., c.v. Colombia. 53:273–280.
2. Alvarez G.M. La selección asistida por marcadores (MAS, “Marker-assisted selection”) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). vol.32 no.2 La Habana abr.-jun. 2011.
3. Alvarado A. G. 2005. Evolución de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en Colombia. p. 99-116.
4. Alvarado A. G. 2005 Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de caturra x híbrido de timor. Volumen 56 pag110-126.
5. Alzate O. N. 2013. Curso Biotecnología II. Actividad 8. Pag. 5.
6. Avelino j. Et-al 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. DOI 10.1007/s12571-015-0446-9.
7. Burdon, J. J. 1993. Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. In: Jacobs., Th.; Parlevliet., J.E. (Eds.). Durability of disease resistance. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher. Pag. 41-55.
8. Castillo Z., L. J.; Leguizamón C., J: 1992. Virulencia de *Hemileia vastatrix* determinada por medio de plantas diferenciales de café en Colombia. Cenicafé 43(4): 114-124.
9. Cano S.C.G. et-al 2012. Borradores de economía: El mercado mundial del café y su impacto en Colombia. No. 710.
10. Corrales D., et-al 2014. A new dataset for coffee rust detection in Colombian crops base on classifiers. Colombian crops base on classifiers. Revista S&T, 12(29), 9-23.
11. Cristancho, M. A., Roza Y., Escobar C., Rivillas O.C.A, Gaitan BA.L, 2012. Razas de Roya, epidemias del 2008 al 2011. Pag 1-8.
12. Cristancho, M. A., et-al. 2012. Outbreak of coffee leaf rust *Hemileia vastatrix* in Colombia. In: New Disease Reports Paginas 19-25.

13. Cristancho A., M.; Escobar o., c.; Ocampo, J.D. Evolución de razas de *H. vastatrix* en Colombia. *Cenicafé* 58(4): 340-359.2007.
14. Da Silva S.F.; de Souza P.E., Pozza e.a., Miranda J.C., Carvalho E.A., Monteiro F. L.h, Alexandre P. A.a. 2008 Adubação orgânica, nutrição e progresso de cercosporiose e ferrugem-do- cafeeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 43:783-791.
15. De Brito G. et-al 2010, et al. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*. 2010;173(2):255-264.
16. Dorado P.G. 2008. Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) 1.995. Página 1-18.
17. Departamento económico y parcial FAO 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i1683s/i1683s.pdf>
18. EGEA G.C, et-al 2003, Isolation of Resistance Gene Analogs in Pepper Using Modified AFLPs. *Biologic Plantarum*. Página 47(1):27-32.
19. Escobar O., C.; Cristancho A., M. Estudio de metodologías para la conservación de urediniosporas de la roya del cafeto. *Cenicafé* 58(4): 324-332.2007.
20. Franco J.L. et-al. 2008 Instituto Nacional de Investigaciones del Genoma Humano. Definición de marcador genético. Páginas 490-500.
21. Freitas. S.J.C et-al 2004. Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. Página 20.
22. El mundo del café. 2008. Disponible en [http://www.bedri.es/Comer\\_y\\_beber/Cafe/El\\_cafe\\_en\\_el\\_mundo.htm](http://www.bedri.es/Comer_y_beber/Cafe/El_cafe_en_el_mundo.htm).
23. García B.F.A. 2012. Identificación y caracterización de marcadores moleculares de introgresión provenientes de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. en líneas de *Coffea arabica* L. Pág. 29, 33, 45.
24. Getrude O. et-al 2014. Advances in the Management of Coffee Berry Disease and Coffee Leaf Rust in Kenya. *JRA* 2014, 2(1):5-10 .Journal of Renewable Agriculture DOI: 10.12966/jra.03.02.2014

25. Guglielmo C. Z. 2009, Genetic engineering applied to coffee, UDO Agrícola 9 (3): 475-486.
26. Gutiérrez Z.G. 1993 .Biología de *Coffea arabica*. Páginas 3-6.
27. Guerreiro F.O. 1970 Mejoramiento sostenible del café arábica por los recursos genéticos. Página 1-11.
28. Gonzàles G.R. et-al. 2013. Ficha técnica roya del cafeto, *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Página 1-16.
29. Gonzales M.L.F. 2009 Validación de marcadores moleculares ligados al gen SH3 de resistencia contra la roya en introducciones de la colección Colombiana del Café. Volumen 60. Página 366-380.
30. Herrera-Pinilla, Juan Carlos., Cortina G. Hernando, 2011, Introducción del gen SH3 como estrategia para la búsqueda de resistencia durable contra la roya del café.
31. Herrera-Pinilla, Juan Carlos., D'Hont Angelique., and Lashermes Philippe. 2007. Use of fluorescence in situ hybridization as a tool for introgression analysis and chromosome identification in coffee (*Coffea arabica* L.). Volumen 50. Pag. 619-626.
32. Hiroshi S.G. et-al 2007. Resistance to Leaf Rust in Coffee Carrying SH3 Gene and others SH Genes. Vol. 50: pp 753-757.
33. Laetitia Mahe., Combes Marie-Christine., Va'rze Vitor M. P., Claire Guilhaumon. 2007. Development of sequence characterized DNA markers. Pag 105-113.
34. Levitus G. et-al. 2004 Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Página 170-183.
35. Leguizamón C., J.E.; Baeza A., C.A.; Fernández B., O.; Moreno R., L.G.; Castillo Z., J.; Orozco C., F.J. Identificación de la Raza II de *Hemileia vastatrix* Berk y Br. en Colombia. Cenicafé 35(1):26-28. 1984.
36. Mayne, W. W. 1932. Physiological specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., Nature 129 (3257): 510..
37. Mahé L. C. Et-al. 2008. Development of sequence caracterizad DNA markers linked to leaf rust *Hemileia vastratrix* resistance in coffee *Coffea arabica* L.. Molecular breeding. Volumen 21 , Número 1 , pp 105-113.

38. Mather, K. ; Jinks, J. Introduction to biometrical genetics. New York, Cornell University Press, 1977. 231p.
39. Medina M., Yanes M., Lis, Z.C. Selección Asistida por Marcadores Moleculares (MAS) vs Selección Fenotípica Convencional. Facultad de Agronomía 2000-2001, Pag. 1-7.
40. Monaco, L. C. 1977. Consequences of the introduction of coffee rust into Brazil. In: PR Day, ed. The Genetic Basis of Epidemics in Agriculture. Página 48-96.
41. Montoya O.G.E. et-al 2006. Análisis de secuencias de genes de *Coffea arabica*. Var. Caturra. Página 79-87.
42. Moreno. R. et-al., 2000. La variedad Colombia; veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. Boletín Técnico (22): 1-32.
43. Monroig M.F. 2010 Ecos del café. Disponible en <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id4.htm>
44. Noir S, et-al 2001. Origin, diversity and evolution of NBType disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). Molecular Genetics and Genomics. 265(4):654.
45. Rayner RW, 1961. Germination and penetration studies on coffee rust *Hemileia vastatrix* B. & Br. Annals of Applied Biology. Pagina. 497-505
46. Rey O.A.M. 2013. Biotecnología II. Pag 137-161.
47. Ribas Alessandra F , Alberto Cenci , Marie-Christine Combes , Hervé Etienne, Philippe Lashermes, Organization and molecular evolution of a group of genes for resistance to diseases in coffee plants. BMC Genomics. 2011; 12: 240.
- 48.. Publicado en Internet el 16 de mayo 2011
49. Rivillas C.A.; GIL Rodríguez L.F.; Leguizamón, J.E. 2005. Recomendaciones para el manejo de la roya del cafeto en Colombia. Boletín Técnico No. 19. 2ª Ed. CENICAFE.
50. Rivillas, O. C., Serna, G. C., Cristancho, A. M. y Gaitán, B. A. 2011. La Roya del Cafeto en Colombia (Impacto, manejos y costos del control, resultados de investigación). Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé). Chinchiná, Caldas, Colombia. Página 53.

51. RODRIGUES Jr., C. J, et-al. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Annual Review of Phytopatology 13: 49-70..
52. Romero J.V. et-al 2010. Caracterización citogenética y morfológica de híbridos interespecíficos entre *C. arabica* y las especies diploides *C. liberica* y *C. eugenioides*. Páginas 206-221.
53. Romero-guerrero, Gladys, Herrera-Pinilla, Juan Carlos, Ligarreto-Moreno, Gustavo A, Alvarado, Gabriel Alvarado. 2008. Análisis genético de la resistencia incompleta a *Hemileia vastatrix* en progenies de caturra x híbrido de timor. Volumen 59, pag 103-119.
54. Rojas A.R. 2013. Genoma del café: Solución o utopía. Disponible en <http://www.cenicafe.org/es/index.php/forums/viewthread/>
55. Ruas A. E. et-al 2013. Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência à Ferrugem do cafeeiro1. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 25 a 28 de novembro de 2013, Salvador – BA.
56. Soriano JM, et-al 2005. Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). TAG Theoretical and Applied Genetics. 110(5):980-989.
57. Federación Nacional de cafeteros de Colombia 2013. Sobre el café. Disponible en: [http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobreelcafe/elcafe/el\\_cafe](http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobreelcafe/elcafe/el_cafe)
58. Tamarin R.H. 2001. Principles of genetics, Seventh edition. Página 15.
59. Vanderplank. 1984: Sanidad vegetal, disponible en: [http://ocwus.us.es/produccionvegetal/sanidadvegetal/Sanidad\\_vegetal/Tema%2019\\_HTML/page\\_12.htm](http://ocwus.us.es/produccionvegetal/sanidadvegetal/Sanidad_vegetal/Tema%2019_HTML/page_12.htm)
60. Variedad Castillo: resistencia a la roya y a la CBD, adaptación a las regiones y calidad, obtenido de [www.cafedecolombia.com/cci-fnc-es](http://www.cafedecolombia.com/cci-fnc-es)
61. Varzea., V.; Rodríguez JR., C. J.; Marques, V. D.; Silva., M. C. 2004. International survey of coffee leaf rust pathotypes. Evolution of virulence in *H. vastatrix* detected in resistance coffee varieties. In: Colloque International sur le Café, 20. Bangalore, October 11-15, 2004. Paris, ASIC.

62. Yu YG, et-al 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93(21):11751-11756.
63. Zambolim L.; Zambolim E.; Várzea V. Durable. 2005. Resistance to Coffee Leaf Rust. Universidade Federal de Viçosa, 450p,